



TITLE:

中脳ドパミンニューロン死を制御する内在性保護物質の作用機序に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

衣斐, 督和

CITATION:

衣斐, 督和. 中脳ドパミンニューロン死を制御する内在性保護物質の作用機序に関する研究. 京都大学, 2001, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183316>

RIGHT:

新制

薬

189

中脳ドパミンニューロン死を制御する内在性保護物質の
作用機序に関する研究

2001

衣斐 督和

中脳ドーパミンニューロン死を制御する内在性保護物質の
作用機序に関する研究

2001

衣斐 督和

目次

緒言	1
第1章 中脳ドパミンニューロン死におけるグルタチオン枯渇と グルタミン酸の関与	4
実験方法	4
実験結果	7
考察	13
第2章 培養中脳ニューロンにおけるエストロゲンの神経保護作用	15
実験方法	15
実験結果	
第1節 培養中脳細胞におけるネクロシスおよびアポトーシスの検出	17
第2節 グルタミン酸神経毒性に対する 17 β -estradiol の神経保護作用	19
第3節 17 β -estradiol の抗アポトーシス作用	24
考察	30
第3章 培養中脳ニューロンにおける活性型ビタミンDの神経保護作用	33
実験方法	33
実験結果	35
考察	43
総括および結論	46
謝辞	47
発表論文目録	48
引用文献	49

緒言

Parkinson's disease は 1817 年に James Parkinson により報告された、筋固縮、無動、振戦を三主張とする錐体外路障害であり、これは線条体に神経繊維を投射する中脳黒質緻密部下パミンニューロンの選択的な脱落により生じる線条体内でのドパミン量の減少が原因で引き起こされる神経変性疾患である。この選択的なドパミンニューロン死の詳細な機序は未だ不明であるが、種々の原因により細胞内で過剰産生されるラジカルが関与することが指摘されている。パーキンソン病患者の剖検脳より、ミトコンドリア呼吸鎖の complex I の活性低下に加えて、glutathione (GSH) 量の減少や、glutathione reductase (GPx)、catalase 活性の低下による抗酸化系の破綻や鉄の増加が報告されている。すなわち、パーキンソン病の中脳黒質において、過剰産生された過酸化水素は、水に無毒化されずに鉄の触媒下 Fenton and Haber-Weiss 反応により細胞傷害性の強い hydroxyl radical へ変換されることが、パーキンソン病のドパミンニューロン死に関与すると考えられる。さらにパーキンソン病では視床腹部を起始核とするグルタミン酸作働性ニューロンの過剰興奮が示唆されているが、ドパミンニューロン死へのグルタミン酸の関与の詳細は未だ解明されていない。生理条件下においてグルタミン酸は興奮性伝達物質として作用するが、病的条件下において過剰遊離されたグルタミン酸は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の過剰な活性化による細胞内へのカルシウム流入とそれに続く一酸化窒素 (NO) や活性酸素の過剰産生によりニューロン死を惹起することが広く認められている。従って、ラジカル誘発神経毒性に基づくドパミンニューロン死の詳細な機序解明した上で、神経保護活性物質を探索することは、パーキンソン病の予防・治療薬の創製する上で非常に重要である。

末梢において、個体の生命維持に重要な役割を果たしてきた内在性物質が、脳においても作用を発現することが報告されている。このうち、第二次性徴発現や性周期を司る女性ホルモンのエストロゲンは、神経細胞の分化誘導に加え、記憶や認知など高次脳機能に関与することが報告されている。一方、神経細胞が死滅する神経変性疾患において、エストロゲンが与える影響については明らかにされていない。しかし疫学調査において、閉経後のエストロゲンレベル減少とアルツハイマー病の危険度との関連性や閉経後のエストロゲン補充療法によるアルツハイマー病罹患率の減少が報告されている。また、パーキンソン病においても、その罹患率は男性よりも女性の方が低いことが報告されている。一方、末梢でミネラル調節を司るビタミン D は、生理条件下における脳での作用の詳細は未だ不明であるが、パーキンソン病において、血清中のビタミン D とその代謝物の減少が報告され、さらにビタミン D がパーキンソニズムを改善することが報告されている。これらの知見は、エストロゲンおよびビタミン D が神経変性疾患の発症および進行を抑制する可能性を提供するが、神経変性疾患におけるニューロン死に及ぼす影響については未だ明らかにされていない。

そこで著者は、中脳ドパミンニューロン死の機序解明と神経保護活性をもつ内在性物質の探索および作用機序の解明を行う目的で本研究を行い、以下の新知見を得た。

1. 中脳ドパミンニューロン死におけるグルタミン酸および NO の関与について検討した。その結果、グルタチオン枯渇下において、培養中脳ドパミンニューロンはグルタミン酸および NO 誘発神経毒性が惹起され、この作用には細胞内の遊離鉄が関与することを見出した。
2. 17 β -estradiol は、高濃度のグルタミン酸により誘発されるネクローシスに対して、*de novo* 合成を介さずに細胞内ラジカルレベルを調節することにより保護作用を示した。一方、BSO およびブレオマイシン誘発アポトーシスに対しては、転写活性を抑制することにより保護作用を示した。
3. ビタミン D の活性代謝産物の 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ は、高濃度のグルタミン酸により誘発されるネクローシスに対して、細胞内ラジカルレベルを制御する機能分子の *de novo* 合成を促進することにより保護作用を示した。

これらの研究成果について以下に 3 章に分けて論述する。

なお、本文中および図中で使用した略号は以下の通りである。

BSO:	L-buthionine-[S,R]-sulfoximine
DAB:	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DCF-DA:	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
EMEM:	Eagle's minimum essential medium
DIV:	day in vitro
FITC:	fluorescein isothiocyanate
GSH:	glutathione
GPx:	glutathione peroxidase
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
MAPK:	mitogen activated protein kinase
MAP2:	microtubule associated protein 2
NMDA:	N-methyl-D-aspartate
MPP ⁺ :	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP:	N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAC:	N-acetyl-L-cysteine
NO:	nitric oxide
NOS:	nitric oxide synthase
PBS:	phosphate buffer saline
ROS:	reactive oxygen species
SOD:	superoxide dismutase
TBS:	tris buffer saline
TdT:	terminal deoxynucleotidyl-transferase
TH:	tyrosine hydroxylase
TUNEL:	terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end-labeling
1 α ,25-(OH) ₂ D ₃ :	1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃
24,25-(OH) ₂ D ₃ :	24,25-dihydroxyvitamin D ₃
25-OHD ₃ :	25-hydroxyvitamin D ₃
6-OHDA:	6-hydroxydopamine

第1章

ドパミンニューロン死におけるグルタチオン枯渇と グルタミン酸神経毒性の関与

パーキンソン病は、筋固縮、無動、振戦を三主徴とし、中脳黒質緻密部ドパミンニューロン死を特徴とする神経変性疾患であるが、そのドパミンニューロン死の詳細な機序は未だ明らかにされていない。しかし、このニューロン死には抗酸化系の破綻により過剰産生されるラジカルが大きく関与すると考えられている。ドパミンニューロンは、生理的条件下において、伝達物質であるドパミンの酵素的または非酵素的酸化により、過酸化水素をはじめとするラジカルを過剰産生する[1,2]。これに加えてさらにパーキンソン病ではミトコンドリア complex I の活性低下による superoxide とそれに続く過酸化水素の過剰産生が引き起こされるが、過酸化水素の解毒に関与する抗酸化系の破綻と鉄濃度の上昇が生じているため、過剰な過酸化水素は水に無毒化されず、より細胞傷害性の強い hydroxyl radical に変換されることにより、ドパミンニューロン死が惹起されると想定されている [3,4,5,6]。抗酸化系の中でも黒質グルタチオン量がパーキンソン病の初期より顕著に減少することが報告されている[7]。またパーキンソン病では視床腹部を起始核とするグルタミン酸作働性ニューロンの過剰興奮が示唆されている[8]。グルタミン酸は生理条件下では興奮性伝達物質として作用するが、過剰遊離されたグルタミン酸は *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の過剰な活性化による細胞内へのカルシウム流入とそれに続く一酸化窒素 (NO) や superoxide 等のラジカルを産生することによりニューロン死を惹起することが報告されている[9]。しかし、パーキンソン病のドパミンニューロン死におけるグルタミン酸または NO 誘発神経毒性の関与は明らかにされていない。そこで本章では、ドパミンニューロン死におけるグルタチオン枯渇とグルタミン酸および下流で産生される NO 誘発神経毒性の関与について、初代分散中脳培養細胞を用いて検討した。

実験方法

初代中脳分散培養の作製と維持

Wistar 妊娠ラット（確定妊娠16日目）をペントバルビタール（50 mg/kg ip）で麻酔し、常法に従って子宮を摘出した。以降 trypsin 処理までの行程はすべて氷冷ハンクス液中で行った。余分な血液をハンクス液で除去した後、子宮をハンクス液で満たしたシャーレに移し、先鋭ピンセットを用いて胎盤から胎仔を取り出した。実体顕微鏡下において眼科剪刀と先鋭ピンセットを用いて前脳を除去し、後脳を正中線に沿って切断した。U字の肉厚な中脳腹側部を摘出し、ハンクス液中で保存した。得られた中脳腹側部をクリーンベンチに移し、これまでの行程で混入した雑菌等を除去する目的で、10 ml のハンクス液で

10回洗浄した。その後、0.1 % trypsin 中に中脳腹側部を移し、37°C、20 分間反応させた。その後、trypsin の反応を停止するために 40 % のウシ胎仔血清を含有する EMEM で懸濁した。その後、パスツールピペットで細胞塊をピペッティングした後、単離細胞を得るために細胞懸濁液を金属メッシュ (150 mesh/inch) に通し、1000 rpm、5 分の遠沈を行った。遠沈後、上清を除去しさらに 10 ml の 10 % ウシ胎仔血清含有 EMEM で再懸濁し、1000 rpm、5 分の遠沈を行った。得られた細胞のペレットを細胞密度 1.3×10^5 cells/cm² になるように 10 % ウシ胎仔血清含有 EMEM で再懸濁した。この細胞懸濁液をポリエチレニミンでコーティングしたカバースリップ上に播種し、この中脳培養細胞を 5 % CO₂、37 °C 環境下で培養した。培養開始日 (DIV1) から培養 4 日目 (DIV4) までは 10 % ウシ胎仔血清含有 EMEM で、培養 5 日目 (DIV5) から培養 12 日目 (DIV12) までは 10 % ウマ血清含有 EMEM 中で培養し、培地交換は 1 日間隔で血清添加の EMEM を用いて行った。このようにして DIV12 まで維持した中脳培養系のニューロンとグリア細胞を免疫染色で同定しそれぞれの割合を求めたところ、ニューロンのマーカーである抗 microtubule-associated protein 2 (MAP2) 抗体で染色される細胞が 70 % 以上を占めるのに対して、アストロサイトのマーカーである抗 glial fibrillary acidic protein 抗体で染色される細胞は 30 % 以下で、マイクログリアを認識する抗 leukemia common antigen 抗体で染色される細胞は存在しなかった。

免疫染色および細胞毒性の評価

DIV11 に 4 % パラホルムアルデヒドで 30 分間固定を行った。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.2 % triton-X で 30 分間膜の可溶化を行い、3 % ウシ血清アルブミン (BSA) でウサギ由来抗 TH 抗体およびマウス由来抗 MAP2 抗体をそれぞれ 500 倍、400 倍希釈した一次抗体反応液中で 4 °C、一晚反応させた。それぞれの抗原を avidin/biotinylated enzyme complex (ABC) method を用いて検出した。すわなち、翌日 PBS で洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ抗体、およびビオチン標識抗マウス抗体を 1 % BSA で 400 倍希釈した二次抗体反応液を室温で 1 時間反応させ、その後 PBS で洗浄しアビジン・ビオチン複合体を室温で 1 時間反応させた。その後 トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄し、0.07 % ジアミノベンチジン (DAB)、0.018 % 過酸化水素および 0.48 % 硫酸ニッケルアンモニウムを含有する TBS によりそれぞれの抗原を可視化させた。中脳腹側部から作製した中脳培養系で、抗 TH 抗体で染色される細胞はドパミンニューロンのみであることが示されているので、ドパミンニューロンの同定に抗 TH 抗体を用いた。またこの抗 TH 抗体陽性ドパミンニューロンが、抗 MAP2 抗体陽性である全ニューロン数に占める割合は 2-3 % であることから、実験の便宜上、抗 MAP2 抗体陽性ニューロン数を非ドパミンニューロン数とした。細胞毒性の評価として、免疫染色により染色された生存ニューロンを顕微鏡下で計数し、対照群 (Sham 処置群) の細胞数の割合 (生存率) を用いた。

細胞内グルタチオン量の測定

BSO 処置後、DIV9 に DTNB-glutathione reductase recycling method に基づいて細胞内グルタチオン量を測定した。培地を除去した後、氷冷した PBS で洗浄し細胞を回収した。細胞をホモジナイズした後、15000 g で 20 分間遠沈した。得られた上清に 10 % トリクロロ酢酸を加えた後、さらに 15000 g で 2 分遠沈し上清をグルタチオン測定に用いた。この酸可溶画分に、0.5 mM EDTA 含有した 10 mM PBS を 500 μ l、4 mM NADPH を 50 μ l、6 U/ml の glutathione reductase を 100 μ l 加えて 15 分間室温で反応させた。さらに 10 mM の 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) を 50 μ l 加え、412 nm の吸光度を測定した。また、グルタチオンを標準物質として測定し、その吸光度から試料中のグルタチオン量を算出し、タンパク量で補正した。なおタンパク量は Bio-Rad protein assay を用いて測定した。

統計処理

データはすべて Mean \pm S.E.M. で示した。Dunnett's test を用いて検定を行い、危険率が 5 % 未満のとき統計学的有意差があると判断した。

実験結果

グルタチオン枯渇薬による細胞内グルタチオン量とドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの生存率の低下

DIV8 にグルタチオン枯渇薬である L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO) を 24 時間投与することにより、細胞内グルタチオン量が濃度に依存して減少した (図 1-1A)。BSO の投与により、抗 MAP2 抗体陽性細胞数より算出される非ドパミンニューロンの生存率および抗 TH 抗体陽性細胞数より算出されるドパミンニューロンの生存率が濃度依存的に減少した。しかし 1 μ M BSO 処置では非ドパミンニューロンの生存率は著明に減少したが、ドパミンニューロンでは有意な生存率の減少は観察されなかった (図 1-1B)。パーキンソン病初期から黒質のグルタチオン量が 40 % まで減少することが報告されていることから、以降の実験において 1 μ M BSO を用いることにした。

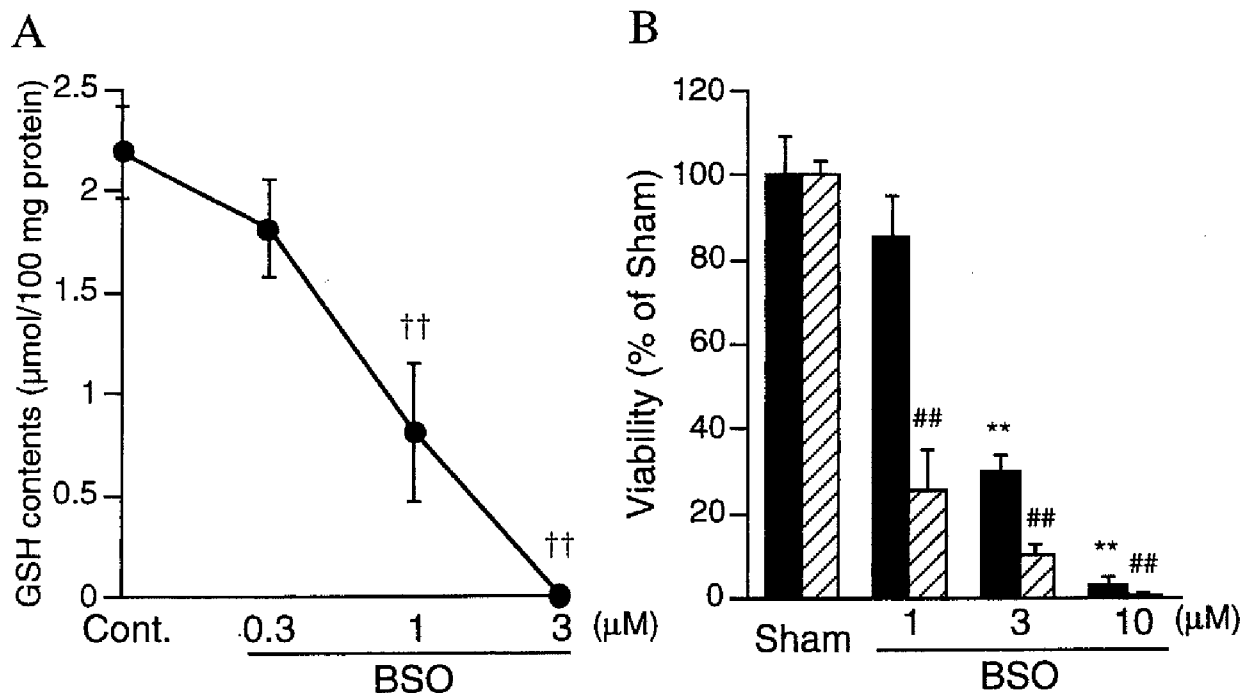


図 1-1 BSO による細胞内グルタチオン量 (A) とドパミンニューロンと非ドパミンニューロンの生存率 (B) に与える影響

培養 8 日目に培養細胞を BSO で 24 時間処置し、その後グルタチオン量を測定した。BSO による生存率の変化は、BSO の 24 時間投与後、BSO 不含培地で 48 時間インキュベートした後に、免疫染色により検討した。Sham 処置は薬物不含培地を入れ替えることで行った。Closed bar および hatched bar はそれぞれドパミンニューロン、非ドパミンニューロンの生存率を示す。 $\dagger\dagger P < 0.05$ vs. control, $\ast\ast, \#\# P < 0.01$ vs. Sham

低濃度グルタミン酸およびNOドナーの長期投与により惹起される神経毒性における両ニューロンの脆弱性の相違

DIV 9 にグルタミン酸 (0.1-10 μM) を 24 時間処置することにより、非ドパミンニューロンの生存率が濃度に依存して減少した。それに対し、ドパミンニューロンの生存率は 10 μM のグルタミン酸処置により減少する傾向はあるものの、有意な減少は観察されなかった (図 1-2A)。また、長い半減期 ($t_{1/2}=21\text{hr}$) を有する NO ドナーの NOC-18 (30-100 μM) を 24 時間処置したところ、グルタミン酸と同様、非ドパミンニューロンの生存率は濃度依存的に減少したが、ドパミンニューロンの生存率は NOC-18 により影響を受けず、NOC-18 誘発神経毒性に対して抵抗性を示した (図 1-2B)。

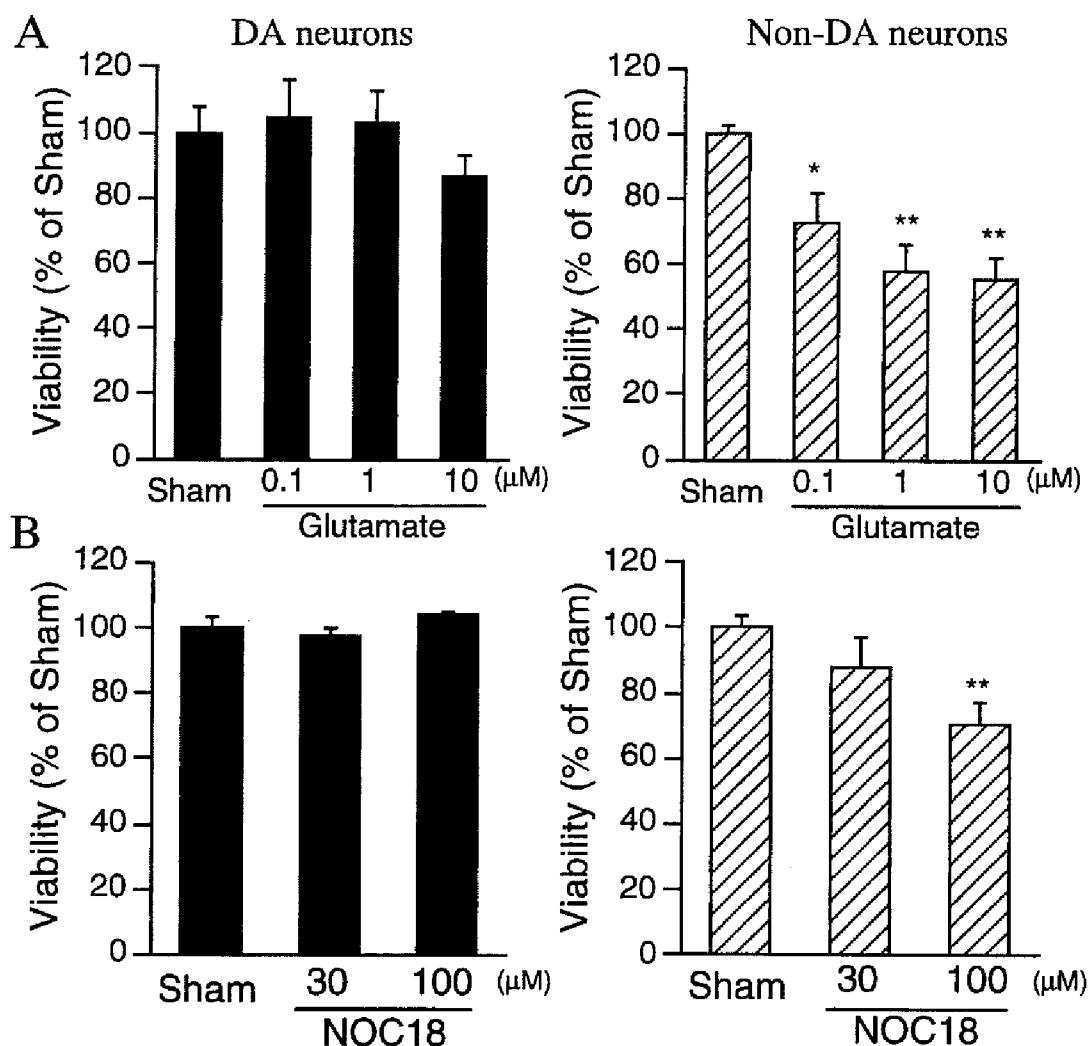


図 1-2 低濃度グルタミン酸 (A) および NO ドナー (B) の長時間投与による生存率への作用

培養 9 日目に培養細胞をグルタミン酸または NO ドナーの NOC18 で 24 時間投与し、その後薬物不含培地で 24 時間インキュベートした。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Sham

非ドパミンニューロンにおける NOC18 誘発神経毒性は細胞内グルタチオンを約 2 倍に増加させる 300 μ M *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) によりほぼ完全に抑制された (図 1-3)。

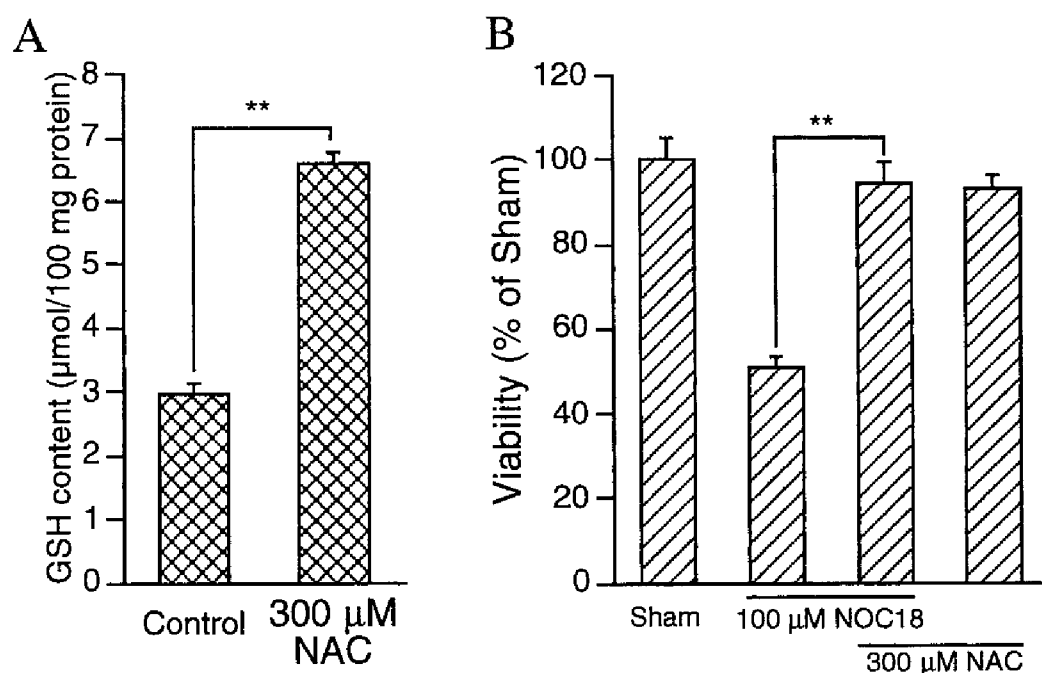


図 1-3 細胞内グルタチオン (A) と NOC18 誘発非ドパミンニューロン死 (B) に対する *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) の作用

培養 10 日目に NAC の 24 時間処置された細胞をグルタチオン測定に用いた。NAC による生存率の変化は、培養 9 日目に NOC18 と同時に NAC を 24 時間投与し、その後 24 時間薬物不含培地でインキュベートした細胞を免疫染色により検討した。** $P < 0.01$

グルタチオン枯渇下におけるグルタミン酸および NO 誘発神経毒性

DIV8 に 1 μ M BSO の 24 時間投与を、DIV9 に 100 μ M NOC18 の 24 時間投与を行った。図 1-4 で示される抗 TH 抗体を用いた免疫染色の顕微鏡写真から、BSO または NOC18 の単独処置群は Sham 処置群と比較してドパミンニューロン数の減少および突起の形態変化はほとんど観察されなかったが (図 1-4A, 4B, 4C)、BSO 処置後 NOC18 を投与することによりドパミンニューロン数の著明な減少、および突起の縮退が観察された (図 1-4D)。

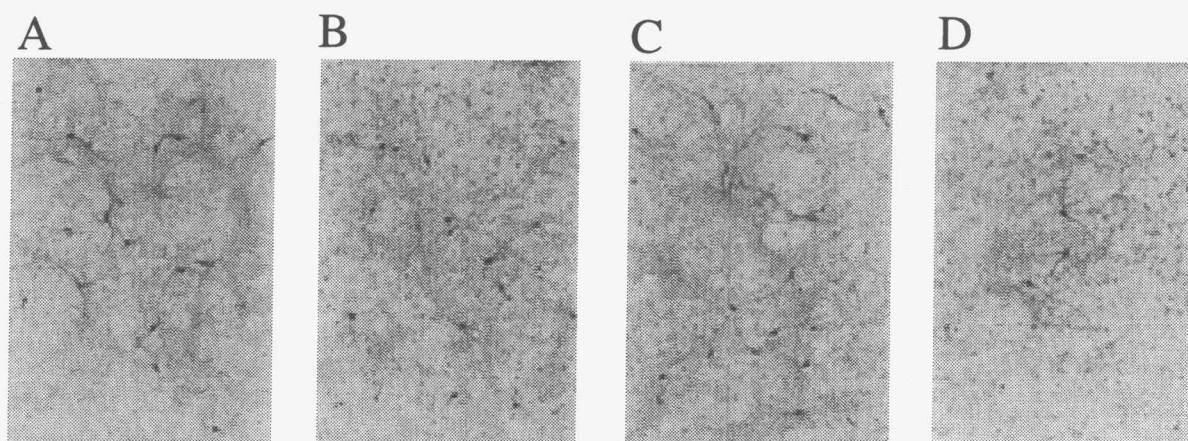


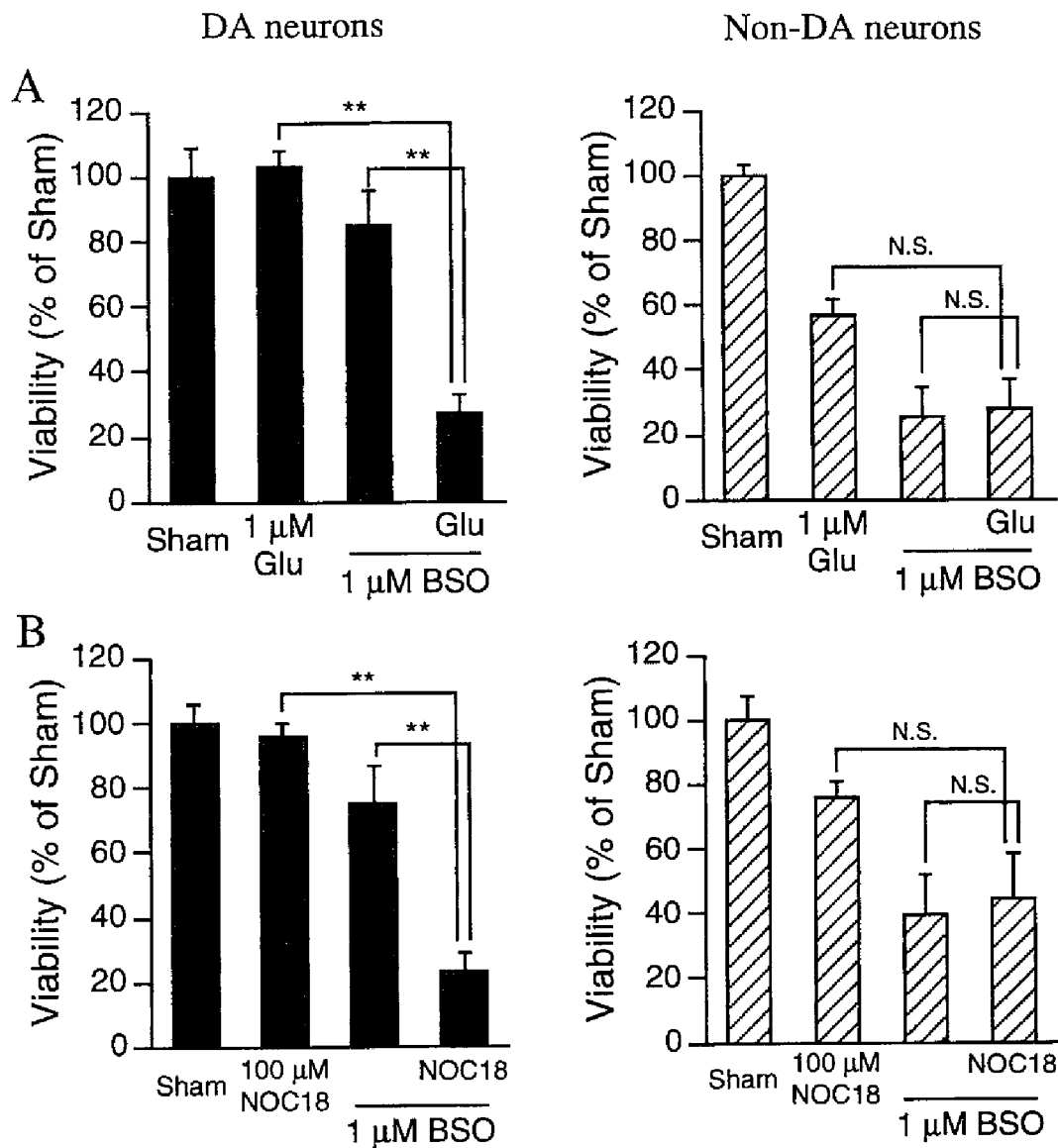
図 1-4 各薬物処置後のドパミンニューロンの典型例

培養 11 日目に抗 tyrosine hydroxylase 抗体を用いた免疫染色によりドパミンニューロンを検出した。Sham 処置群 (A)、培養 8 日目に 1 μ M BSO で処置された細胞群 (B)、培養 9 日目に 100 μ M NOC18 で処置された細胞群 (C)、および、BSO の 24 時間投与後さらに NOC18 を 24 時間処置された細胞群 (D) のドパミンニューロンの顕微鏡写真を示す。各処置後、培養 11 日目まで薬物不含培地でインキュベートした。スケールバーは 200 μ m を示す。

図 1-5 に各処置による生存率の変化をまとめたグラフを示す。BSO 投与後にグルタミン酸を投与することにより、グルタミン酸単独投与時と比較してドパミンニューロンの生存率が著明に減少した。(図 1-5A)。次にグルタチオン枯渇下における NOC18 誘発神経毒性を検討したところ、グルタミン酸処置と同様、ドパミンニューロンにおいて NOC18 誘発神経毒性が増強された (図 1-5B)。しかし、非ドパミンニューロンにおいては、BSO により神経細胞死が惹起されたため、グルタミン酸および NOC18 誘発神経毒性は観察されなかった。

図 1-5 グルタミン酸 (A) および NOC18 (B) 誘発神経毒性に対するグルタチオン枯渇の作用 (次頁)

培養 8 日目に BSO を 24 時間投与し、BSO 不含培地でグルタミン酸または NOC18 の 24 時間投与した後、培養 11 日目まで薬物不含培地でインキュベートした。** $P < 0.01$, N.S.: not significant



グルタチオン枯渇により増強されるドパミンニューロンの NO 誘発神経毒性における鉄の関与

NO または ONOO⁻ は iron-responsive element binding protein や aconitase と反応することにより、細胞内遊離鉄濃度を上昇することが報告されている。そこでグルタチオン枯渇下で惹起されたドパミンニューロンの NO 神経毒性増強作用に細胞内の遊離鉄が関与するか否かを検討した。鉄のキレーターである deferoxamine を NOC-18 と同時に投与を行ったところ、NO 神経毒性の増強は deferoxamine の濃度に依存して抑制された (図 1-6A)。しかし、非ドパミンニューロンにおいては deferoxamine は何ら影響を与えなかった (図 1-6B)。また deferoxamine は BSO または NOC-18 単独処置による生存率の変化に何ら影響を与えなかった (図 1-7)。

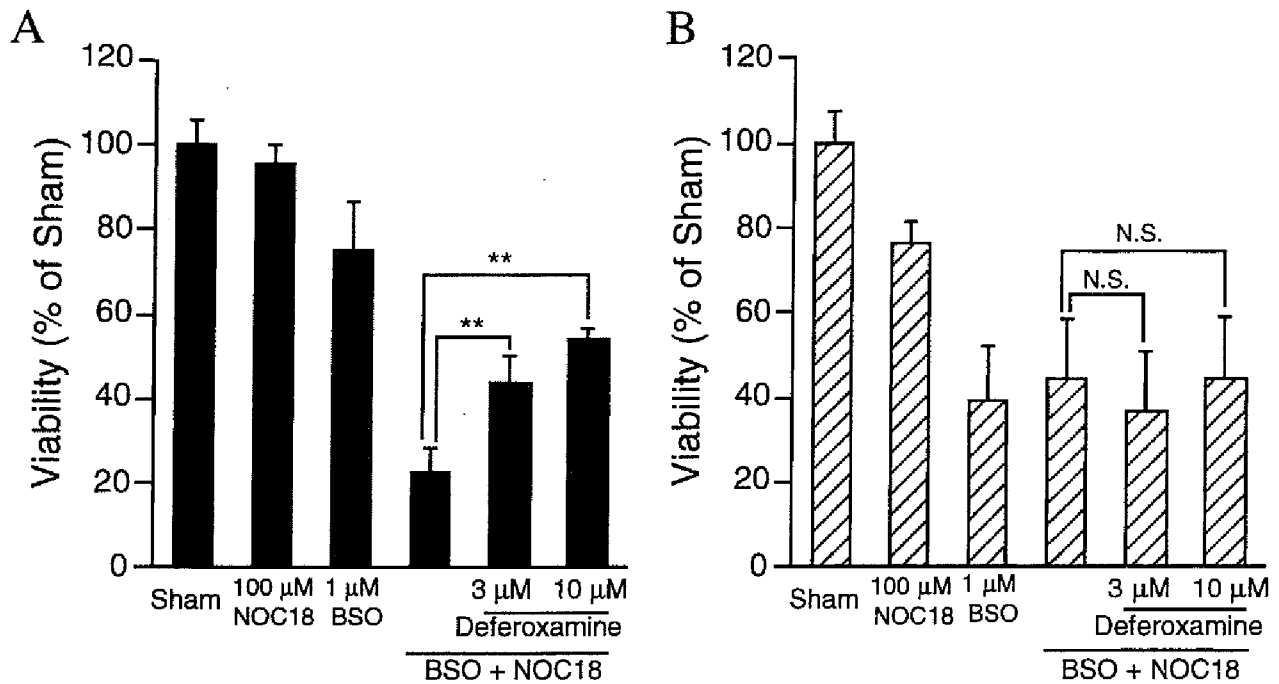


図 1-6 グルタチオン枯渇により惹起された NOC18 誘発神経毒性の増強に対する deferoxamine の作用

培養 9 日目に NOC18 と同時に deferoxamine を 24 時間投与し、その後培養 11 日目まで薬物不含培地でインキュベートした。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, N.S.: not significant

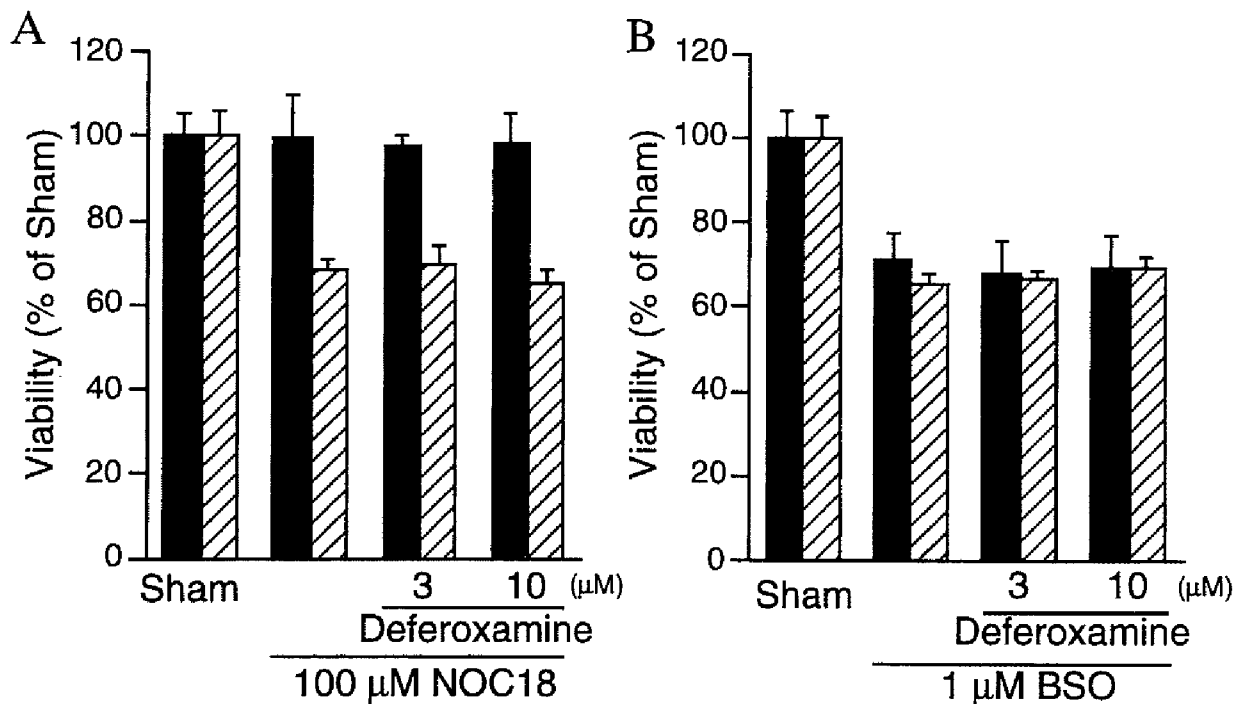


図 1-7 BSO および NOC18 誘発神経毒性に対する deferoxamine の作用

培養 8 日目に BSO と deferoxamine を、培養 9 日目に NOC18 と deferoxamine を同時に 24 時間投与し、その後、培養 11 日目まで薬物不含培地でインキュベートした。

考察

パーキンソン病における中脳ドパミンニューロン死の詳細な機序は未だ不明であるが、多くの研究より抗酸化系の破綻の結果、過剰産生されるラジカルが大きく関与すると指摘されている [10]。そのなかでも、パーキンソン病初期から黒質グルタチオン量の減少が認められている [7]。また視床腹部を起始核とし、中脳ドパミンニューロンに投射しているグルタミン酸作働性ニューロンの過剰興奮が示唆されているが [8]、パーキンソン病におけるドパミンニューロン死におけるグルタミン酸および NO 神経毒性の関与については明らかにされていない。本研究において、グルタチオン枯渇下で低濃度のグルタミン酸および NO がドパミンニューロン死を増強し、その機序に細胞内遊離鉄が関与することを見いだした。

中脳培養細胞にグルタチオン合成の律速酵素の γ -glutamylcysteine synthase に対する不可逆的阻害薬の BSO [11] を 24 時間投与すると、細胞内のグルタチオン量が濃度に依存して減少した。グルタチオン量の減少に伴い、ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの生存率が減少したが、非ドパミンニューロンにおいてより脆弱性を示した。グルタチオンは細胞内で 1-10 mM と豊富に存在するシステイン含有トリペプチドで、抗酸化作用以外に細胞内の redox を調節する。グルタチオン枯渇による抗酸化系の破綻の結果、過剰産生されるラジカルが、TCA 回路抑制やミトコンドリア機能障害、神経型 12-lipoxygenase の活性化を介した過酸化物生成とカルシウム流入、sphingomyelinase の活性化による ceramide 産生、可溶性 guanylyl cyclase の活性化など様々なカスケードを介して細胞死を惹起する [12,13,14]。

グルタミン酸および NO ドナーの NOC18 を長時間投与すると、非ドパミンニューロンにおいて細胞死が惹起されたが、ドパミンニューロンはこれら神経毒性に抵抗性を示した。グルタミン酸神経毒性の機序は、グルタミン酸による NMDA 受容体の刺激を介した細胞内へのカルシウム流入とそれに続く NO の過剰産生であることが、多くの研究室で報告されている [15,16]。このグルタミン酸神経毒性の主因である NO 神経毒性に対してドパミンニューロンが抵抗性を獲得するメカニズムに、SOD およびグルタチオンが関与すると考えられる。ドパミンニューロンは非ドパミンニューロンと比較して Cu,Zn-SOD の発現レベルが高いことが報告されている [17]。さらに以前、当研究室で、nNOS を保持するドパミンニューロンの割合は非ドパミンニューロンより大きいことを示し [18]、最近の報告では、nNOS ニューロンは Mn-SOD を高発現することが報告されている [19]。SOD は superoxide を過酸化水素に素早く変換するため、NO と superoxide との反応による細胞傷害性の強い ONOO \cdot の産生が抑制されることで、NO 神経毒性に対して抵抗性を獲得することが考えられる。これらの知見より、ドパミンニューロンに豊富に存在する SOD が NO 神経毒性に対して抵抗性を獲得する一因であることが推測される。SOD に加えて、NO 神経毒性の抵抗性に寄与することが想定されるグルタチオンは、NO または ONOO \cdot との反応性が非常に大きく、S-nitrosothiols や安定型の S-nitrosoglutathione を生成する。これら S-nitroso 化合物は NO または ONOO \cdot の解毒を行うだけでなく、S-nitroso

化合物自身が非神経細胞およびドパミンニューロンにおいてラジカル毒性から保護する作用を有する [20,21]。この NO または ONOO[•] と反応して毒性を軽減するグルタチオンの含有量は不死化ドパミンニューロン株 MN9D は不死化非ドパミンニューロン株 MN9X と比較して顕著に多く存在することを Nakamura らは報告している [22]。また本研究において、グルタチオンの合成促進薬である NAC が、NO 誘発非ドパミンニューロン死を抑制した。これらの結果は、グルタチオンが NO 神経毒性の発現調節に重要な役割を果たし、グルタチオンが多く存在することが想定されるドパミンニューロンにおける NO 神経毒性獲得の要因に豊富に存在するグルタチオンが関与すると考えられる。

グルタチオン枯渇下では、ドパミンニューロンにおいてグルタミン酸および NO 神経毒性が増強されることを示した。この増強作用は鉄キレーターの deferoxamine により抑制されたことから、ドパミンニューロンのグルタミン酸および NO 神経毒性増強作用に細胞内遊離鉄が関与することを示す。グルタチオンは硫黄原子を有することから NO に対して非常に高い反応性を示す。このグルタチオン量が多いことが推定されているドパミンニューロンでは、効率的に NO と反応して nitroso 化合物を生成することにより NO 神経毒性に対して抵抗性を示すと考えられる。一方、グルタチオン枯渇下では、グルタチオンと反応できなくなった過剰の NO が硫黄原子を含有する他のターゲット分子と反応すると考えられる。NO 神経毒性の増強作用に細胞内の遊離鉄が関与することから、ターゲット分子として aconitase および iron-responsive element binding protein (IRE-BP) が挙げられる。Aconitase は活性中心に鉄-硫黄クラスターを活性中心とする酵素で [4Fe-4S] と [3Fe-4S] との変換を行うことで酵素活性を示す。NO または ONOO[•] は硫黄原子と反応することにより [4Fe-4S] クラスターの鉄 1 原子を遊離させ、不活性型の [3Fe-4S] クラスターに変換する。ミトコンドリア aconitase が NO または ONOO[•] と反応すると、鉄の遊離に加えて、aconitase 活性も抑制される結果、ATP 産生が抑制される。一方、細胞質に aconitase 活性をもち、ferritin および transferrin の発現調節を担う IRE-BP も NO または ONOO[•] によりその活性は抑制される [23]。IRE-BP の aconitase 活性が抑制されると、ferritin mRNA の 5'UTR と transferrin receptor mRNA の 3'UTR の stem loop に存在する IRE に結合する結果、ferritin mRNA の翻訳抑制および transferrin receptor mRNA の安定化を引き起こすことで細胞内の遊離鉄濃度を上昇させることが報告されている [24]。実際 NO は IRE-BP の IRE への結合を促進し、細胞内遊離鉄を上昇させる知見が報告されている [25]。ドパミンニューロンではドパミンの酸化により過酸化水素が多く産生されるが、グルタチオン枯渇下では水に変換されず、さらに NO 存在下で増加した細胞内遊離鉄が過酸化水素を細胞傷害性の強い hydroxyl radical に変換することにより、ドパミンニューロン死を惹起すると考えられる。

以上の結果より、低濃度グルタミン酸または NO ドナーの長時間投与により惹起される神経毒性に対して、ドパミンニューロンは抵抗性を示すが、グルタチオン枯渇下ではグルタミン酸および NO 誘発神経毒性が増強し、これには細胞内の遊離鉄が関与することを見いだした。本研究の結果は、黒質のグルタチオン枯渇が生じているパーキンソン病におけるドパミンニューロン死に、グルタミン酸および NO が関与することを示唆するものである。

第2章

培養中脳ドパミンニューロン死におけるエストロゲンの神経保護作用

女性ホルモンであるエストロゲンは、古くから生殖作用や性周期調節作用などの第二次性徴発現のほかに、骨や脂質代謝などの全身作用を有することが示されている。生理条件下の脳において、エストロゲンは細胞分化作用に加え、記憶や認知など高次脳機能に關与する [26,27]。疫学調査より、閉経後のエストロゲン補充療法がアルツハイマー病の罹患率を減少させること、およびパーキンソン病の発症率は男性に対して女性の方が低いことが報告されている [28,29]。また、近年、エストロゲンが大脳皮質および海馬において神経保護作用を発現するとの知見が多数報告されているが、その詳細な保護作用メカニズムは未だ不明である [30,31]。そこで、培養中脳ニューロンにおいて主要エストロゲン中で最も活性が高い 17β -estradiol が神経保護作用を示すか検討した。

第1章でグルタチオン枯渇下において、NO および低濃度のグルタミン酸がドパミンニューロン死を惹起し、そのメカニズムにグルタチオンにより除去されなかった過剰な NO や ONOO \cdot の寄与が示された。以前、当研究室で高濃度グルタミン酸の投与により同様に過剰な NO および ONOO \cdot の産生を引き起こし、これがドパミンニューロン死を惹起することを報告した [32]。そこで本章および第3章において、高濃度グルタミン酸の短時間投与により惹起される神経毒性を指標として、神経保護活性を有する内在性物質の探索を行うとともに詳細な保護作用メカニズムの解析を検討した。なお本章では高濃度グルタミン酸誘発神経毒性に加えて BSO および抗ガン剤のブレオマイシン誘発神経毒性について 17β -estradiol が保護作用を示すか検討を行った。

実験方法

初代中脳分散培養の作製と維持

第1章実験方法に同じ

免疫染色および細胞毒性の評価

第1章実験方法に同じ

Hoechst 染色および TUNEL 染色による核形態変化の解析

DIV8 に薬物処置された中脳培養細胞を DIV9 に Hoechst 染色および TUNEL 染色を施した。DNA intercalator である Hoechst33258 を用いた Hoechst 染色は、室温で 30 分間 10% 中性等張ホルムアルデヒド液を用いて固定した。PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡下で、UV 領域光を照射し核の形態を観察した。In situ で DNA の断片化を可視化する TUNEL 染色は Apoptosis detection kit (Wako) を用いて行った。室温で 10 分間 4% 中性ホルムアルデヒ

ドにより細胞を固定後、0.1% クエン酸ナトリウムと 0.1 % Triton X-100 を含有する溶液で、2 分間氷上で反応させた。洗浄後、TdT と TdT の基質を 37 °C で 10 分間反応させることにより DNA の 3'-OH 末端を標識した。内因性ペルオキシダーゼを不活化させるために 3% H₂O₂ を室温で 5 分間反応させ、ペルオキシダーゼを結合させた抗体を 37°C で 10 分間反応させた。次に、DAB を用いて発色させることにより、DNA の断片化を示す濃褐色の顆粒を検出した。最後に 1% メチルグリーンで対比染色を行い、細胞を可視化させた。

Western blotting によるタンパクの検出

JNK1、JNK2/3 タンパクを western blotting により検出した。薬物処置を行った細胞を DIV9 に lysis buffer (20 mM Tris, 25 mM β-glycerophosphate, 2 mM EGTA, 1% triton X-100, 1 mM vanadate, 1% aprotinin, 1 mM PMSF, 2 mM DTT) を用いて回収し、15000 rpm で 30 分間遠沈した。その上清に等量の sample buffer (124 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue, 4% 2-mercaptoetanol) を加え、5 分間煮沸させることでタンパクの変性と SDS 化を行った。SDS 化させたサンプルを 10-15% SDS-PAGE にアプライし、4 mA で約 1 時間泳動バッファー中で電気泳動を行った。泳動終了後、トランスファーバッファー中で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に 15 V で約 1 時間転写を行った。その後、5 % スキムミルクでブロッキングを行い、抗 JNK1 抗体 (1:500, Santa Cruz)、抗 JNK2/3 抗体 (1:500, Santa Cruz) を一次抗体として、4°C で一晩または室温で 1 時間反応させた。次に horseradish peroxidase 標識二次抗体 (1:1000) を室温で 1 時間反応させた後、ECL-Plus (Amersham) を用いた化学発光検出法により発光させ、フジ x 線フィルムに感光させた。

ラジカルレベルの測定

ラジカルレベルの測定にはラジカルマーカである 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) を用いた [33]。DCF に diacetate を結合させることにより細胞内への移行率を高められた DCF-DA は、細胞内のエステラーゼにより DCF に変換される。DCF は過酸化水素や NO [34] 等のラジカルと反応することで酸化型に変換される。この酸化型 DCF に 488 nm の励起光を照射した結果、得られる 525 nm の蛍光強度を測定することでラジカルレベルの半定量を行った。細胞内ラジカルレベルの測定には共焦点レーザー顕微鏡 (ACAS570, Meridian) を用いて行った。DIV9 の細胞に 100 μM DCF-DA を培地中で 30 分間インキュベートすることで DCF-DA を取り込ませ、その後 3 回洗浄を行い 10 μM H₂O₂ を投与した。一方、無細胞系でのラジカルレベルの測定では、100 μM DCF-DA を含有するリン酸緩衝液中で蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent, Labsystems) を用いて行った。

統計処置

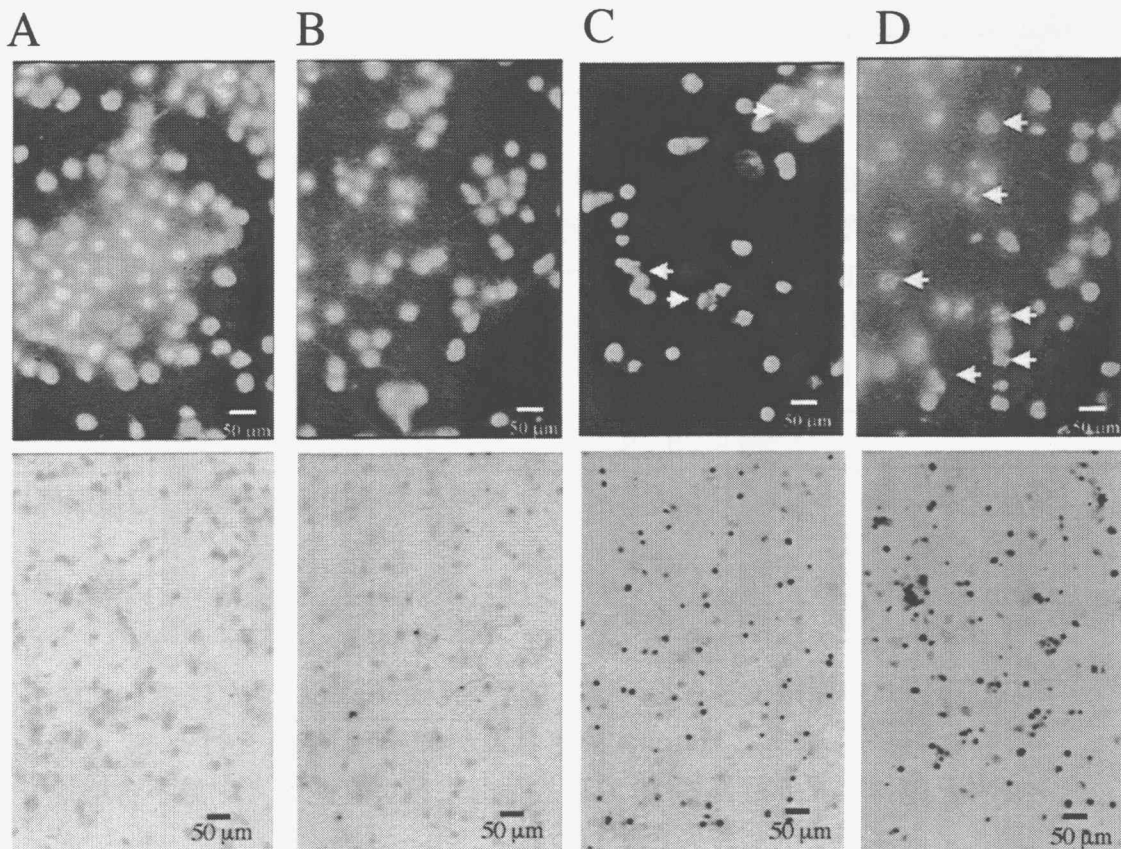
データはすべて Mean ± S.E.M. で示した。Newman-Keuls を用いて検定を行い、危険率が 5 % 未満のとき統計学的有意差があると判断した。

実験結果

第1節 培養中脳細胞におけるネクローシスおよびアポトーシスの検出

グルタミン酸、BSO およびブレオマイシンによる核の形態変化

細胞死は大別して2つの異なった形態をとり、核クロマチンの凝集や DNA 断片化で示される核の形態学的特徴およびカスパーゼ活性化で示される生化学的特徴を兼ね備えたアポトーシスと、これらの変化を伴わないネクローシスに分類される。まず、グルタミン酸または BSO の投与により生じる核の形態変化を Hoechst 染色および DNA の断片化を認識する terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を用いて観察した。また、抗ガン剤でアポトーシスを誘発することが知られているブレオマイシンをポジティブコントロールとして同様の検討を行った。DIV8 にグルタミン酸を 10 分間、または、BSO およびブレオマイシンを 24 時間投与し、DIV9 に Hoechst 染色、TUNEL 染色を行った。図2-1 は各処置を行った細胞の Hoechst 染色および TUNEL 染色の顕微鏡写真を示す。Sham 細胞では Hoechst 染色で核全体が青白く染色され、TUNEL 染色においては濃褐色で染色される陽性細胞は検出されなかった。しかし、10 μ M の BSO または 100 μ M ブレオマイシンを 24 時間投与した細胞では、Hoechst 染色による核クロマチンの凝集や、TUNEL 染色による DNA の断片化を示す濃褐色の顆粒の出現など、アポトーシスに特徴的な核の形態変化が観察された。一方、1 mM のグルタミン酸を 10 分間投与した後、グルタミン酸不含培地で 24 時間インキュベートした細胞では、核クロマチンの凝集や DNA の断片化を引き起こさなかった。



グルタミン酸、BSO およびブレオマイシン誘発神経細胞死へのカスパーゼの関与

次に、グルタミン酸、BSO、ブレオマイシン誘発神経細胞死にカスパーゼが関与するか否かを検討した。Caspase-1 阻害薬の Ac-WEHD-CHO (10 μ M) は BSO およびグルタミン酸誘発神経毒性を抑制しなかったが、ブレオマイシン誘発神経毒性を抑制した。また、caspase-3 阻害薬の Ac-DMQD-CHO (10 μ M) は BSO およびブレオマイシン誘発神経細胞死を抑制したが、グルタミン酸神経毒性を抑制しなかった。以上の結果より BSO 誘発神経細胞死は caspase-3 阻害薬で、およびブレオマイシン誘発神経細胞死は caspase-1 および caspase-3 阻害薬で抑制されることに加え、図 2-1 で示された核凝集や DNA 断片化などアポトーシス様の核形態変化を伴うことから、生化学的および形態学的評価に基づきアポトーシスであることが示された。それに対し、グルタミン酸誘発神経細胞死はネクローシスであることが示された。

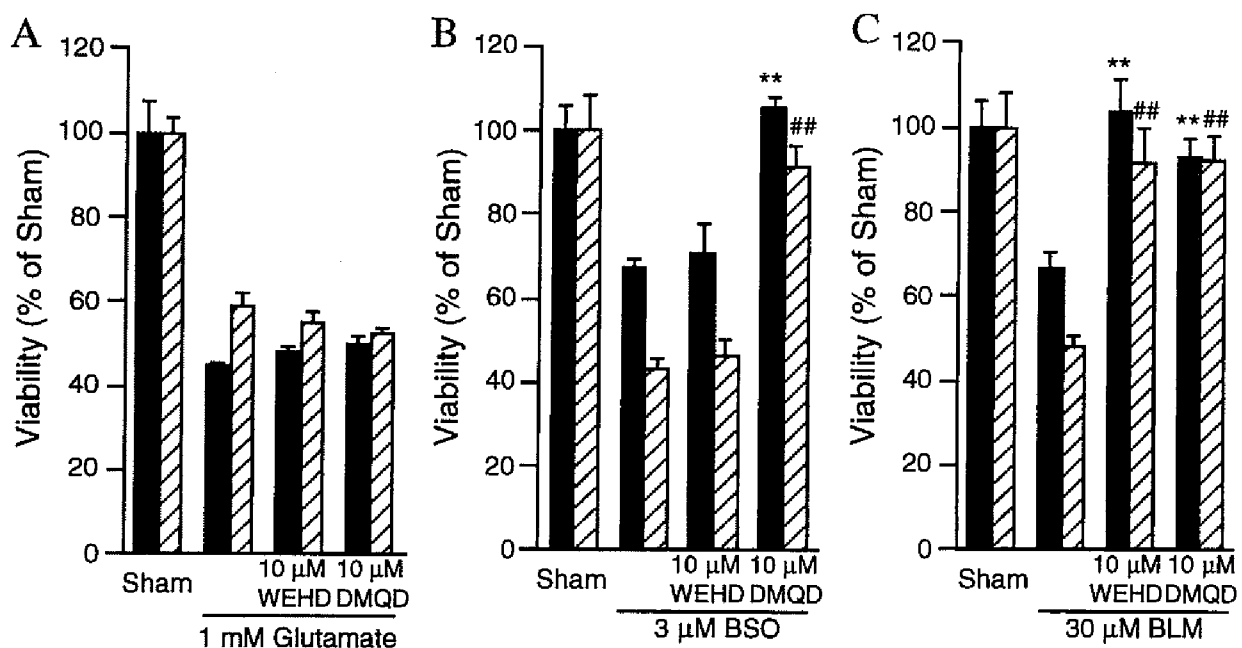


図 2-2 カスパーゼ阻害薬のグルタミン酸 (Glu) (A)、BSO (B)、ブレオマイシン (BLM) (C) 誘発神経毒性における作用

培養 8 日目に BSO およびブレオマイシンを 24 時間、培養 9 日目にグルタミン酸を 10 分間投与した。カスパーゼ阻害薬の投与は、これら神経毒の前投与 24 時間と同時投与 24 時間または 10 分間行った。各薬物投与後、培養 12 日目まで薬物不含培地でインキュベートした。*** $P < 0.01$ vs. BSO or BLM

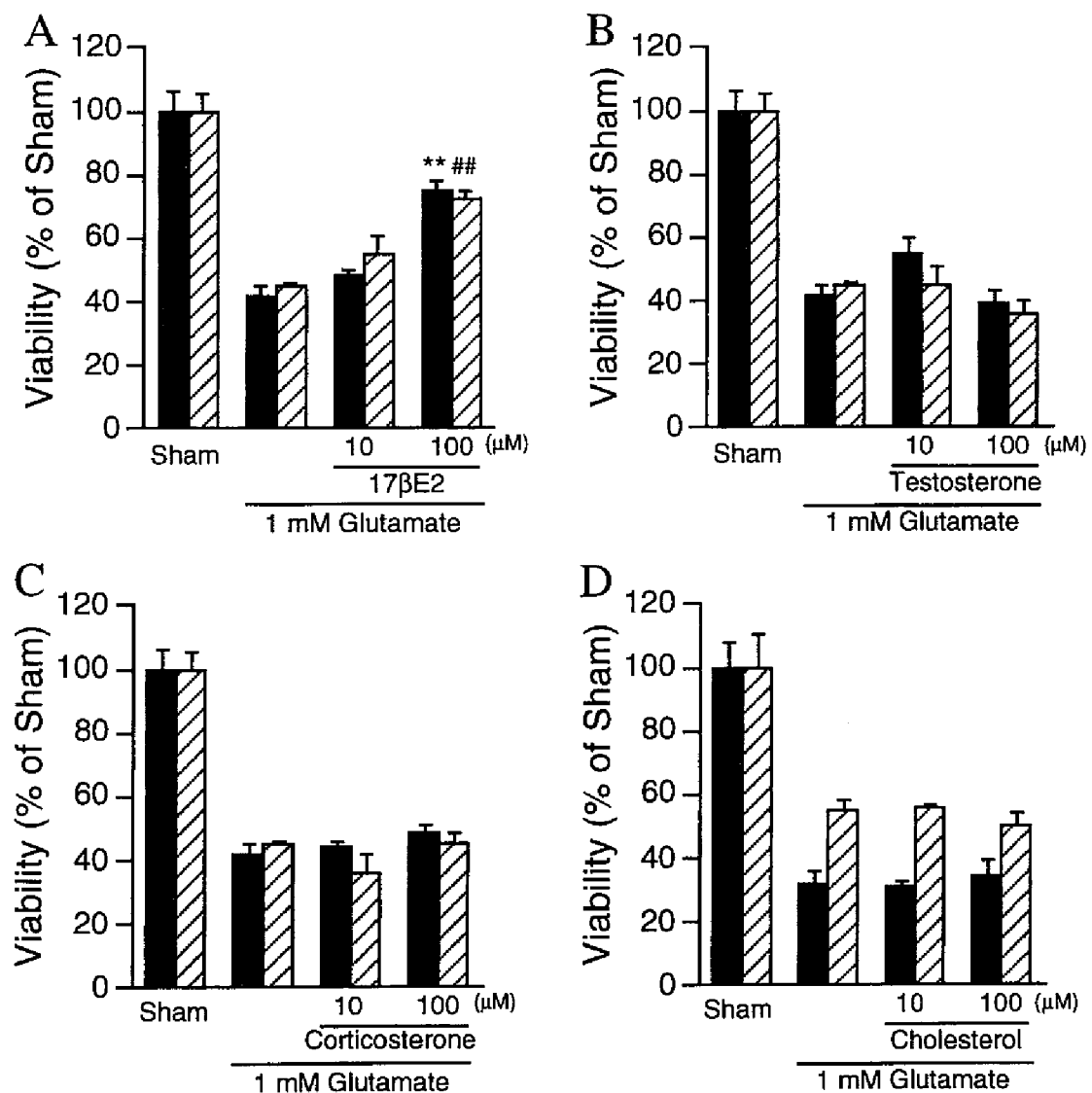
図 2-1 グルタミン酸、BSO、ブレオマイシン投与による中脳培養細胞の核形態変化 (前頁)

Sham 処置群 (A)、1 mM グルタミン酸投与群 (B)、10 μ M BSO 投与群 (C) および 100 μ M ブレオマイシン投与群 (D) の Hoechst 染色 (上段) と TUNEL 染色 (下段) の顕微鏡写真を示す。培養 8 日目に BSO またはブレオマイシンを 24 時間投与した後、Hoechst 染色および TUNEL 染色を行った。一方、グルタミン酸は培養 8 日目に 10 分間投与した後、グルタミン酸不含培地で 24 時間インキュベートし各染色を行った。

第2節 グルタミン酸神経毒性に対する 17β -estradiol の神経保護作用

グルタミン酸神経毒性に対するステロイドの作用

性ホルモンなどのステロイドは、cholesterol を基質とし、ステロイド生合成経路を経て合成される。これらステロイドの中で、 17β -estradiol、testosterone、corticosterone およびこれらの基質となる cholesterol がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示すか否かを検討した。中脳培養細胞に高濃度のグルタミン酸 (1 mM) を 10 分間投与することによりドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの生存率が著明に減少した。DIV8 にステロイドおよび cholesterol をグルタミン酸投与前に 24 時間投与 (前投与 24 時間) を行ったところ、100 μ M の 17β -estradiol のみが有意に両ニューロンをグルタミン酸神経毒性から保護した (図 2-3)。



次に、17 β -estradiol の保護作用における前投与時間の依存性を検討した。100 μ M の 17 β -estradiol を前投与 60 分間行ったところ、両ニューロンをグルタミン酸神経毒性から保護した (図 2-3A)。しかし、17 β -estradiol をグルタミン酸と同時に 10 分間投与した場合、両ニューロンをグルタミン酸神経毒性から保護しなかった (図 2-3B)。

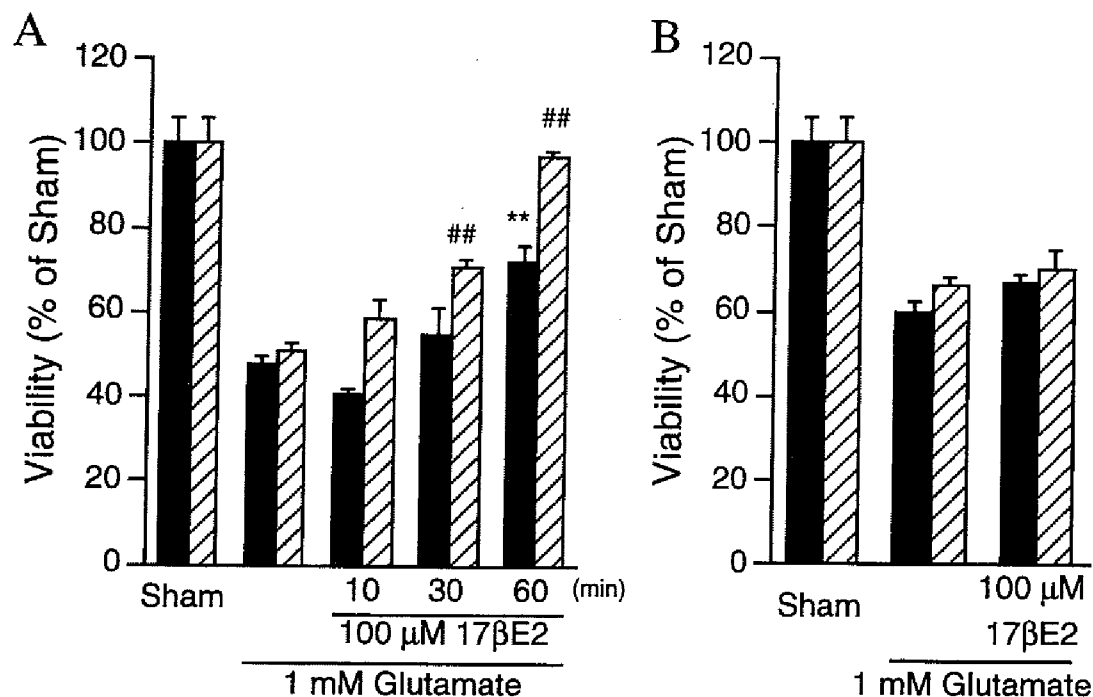


図 2-4 17 β -estradiol の保護作用における前投与時間の関与
17 β -estradiol の投与はグルタミン酸投与前に各時間 (A) またはグルタミン酸と同時 (B) に行った。**、## $P < 0.01$ vs. Glu

17 β -estradiol を前投与したときのみ神経保護作用が観察されたことから、この保護作用に *de novo* 合成を介した機能タンパクの増加が関与する可能性が考えられる。そこで、17 β -estradiol の神経保護作用にタンパク合成が関与するか否かを検討した。タンパク合成阻害薬の cycloheximide を 17 β -estradiol と同時に 24 時間投与を行ったところ、17 β -estradiol の保護作用は有意に抑制されなかった (図 2-5)。

図 2-3 グルタミン酸神経毒性に対する 17 β -estradiol (17 β E2)、testosterone、corticosterone、cholesterol の作用 (前頁)

グルタミン酸投与は培養 9 日目に 10 分間、17 β -estradiol, testosterone, cholesterol, corticosterone は培養 8 日目からグルタミン酸投与前まで 24 時間投与した。培養 9 日目にグルタミン酸を血清不含培地で 10 分間投与し、その後培養 12 日目までグルタミン酸不含培地でインキュベートし、免疫染色を行った。**、## $P < 0.01$ vs. Glu

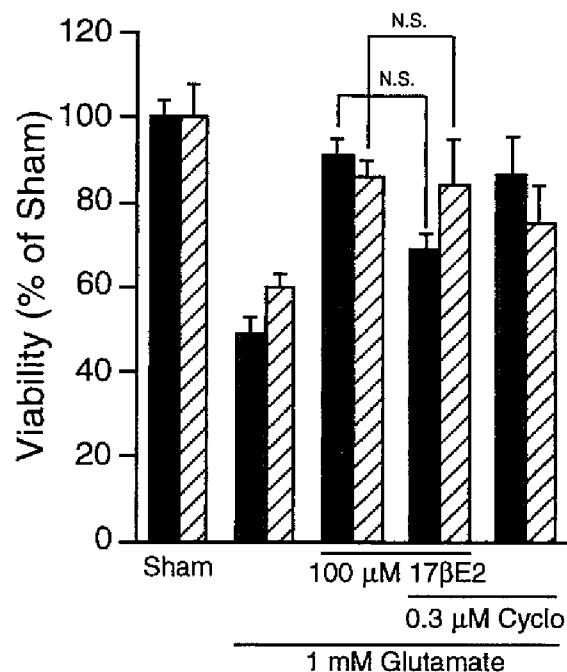


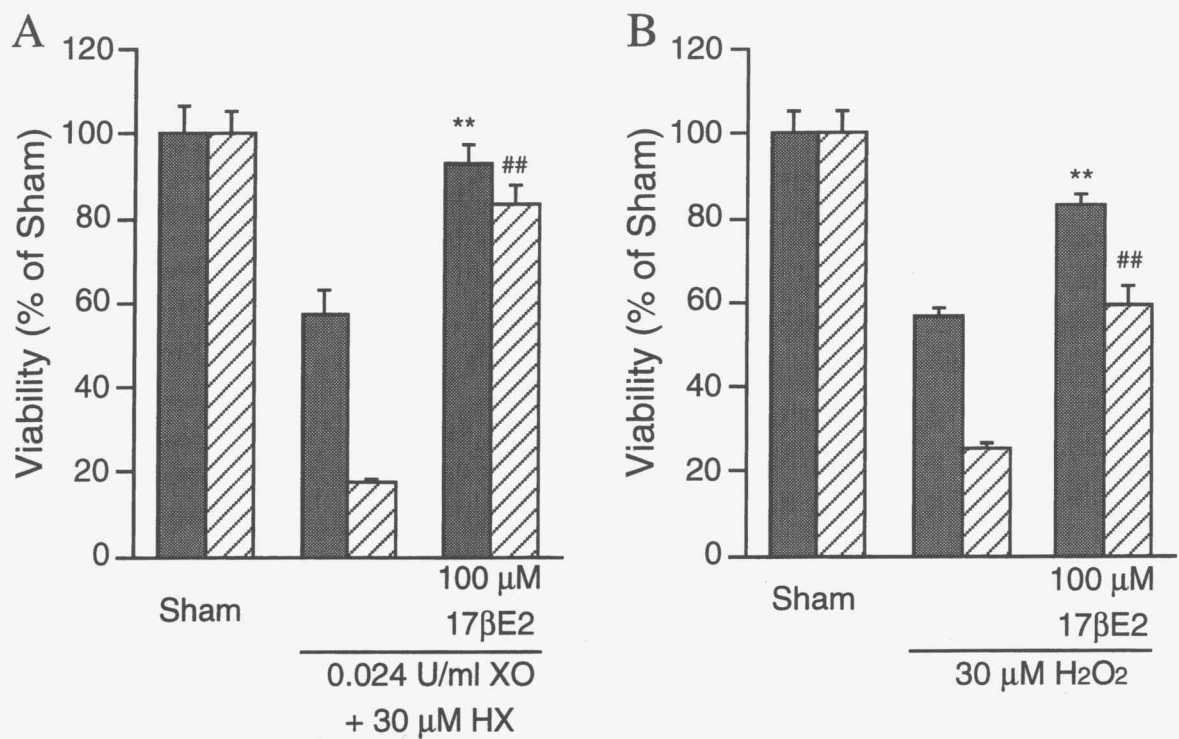
図 2-5 17β-estradiol の保護作用への *de novo* 合成の関与
培養 8 日目に 17β-estradiol 含有培地で cycloheximide を 24 時間投与した。N.S.: not significant

ラジカル神経毒性に対する 17β-estradiol の作用

17β-estradiol がラジカル神経毒性に対して保護作用を示すか否かを検討した。本研究において、ラジカル神経毒性を惹起させるために superoxide を産生する xanthine oxidase と hypoxanthine の混合物 (XO/HX) および過酸化水素の投与を行った。XO/HX または過酸化水素を DIV8 に 10 分間投与することにより、脆弱性の程度差はあるものの両ニューロンの生存率が減少した。17β-estradiol の 24 時間前投与はこのラジカル神経毒性から両ニューロンを保護した (図 2-6)。

図 2-6 ラジカル誘発神経毒性に対する 17β-estradiol の作用 (次頁)

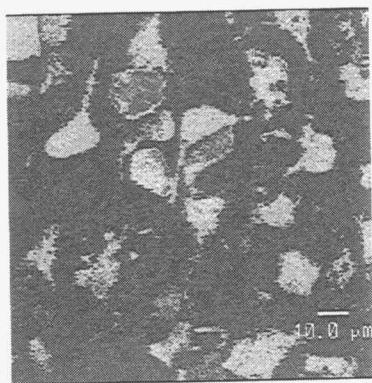
培養 9 日目に xanthine oxidase と hypoxanthine の混合物 (XO/HX) (A) または過酸化水素 (H₂O₂) (B) を血清不含培地で 10 分間投与し、その後薬物不含培地で 72 時間インキュベートした。17β-estradiol は培養 8 日目に 24 時間の前投与を行った。****P* < 0.01 vs. XO/HX or H₂O₂



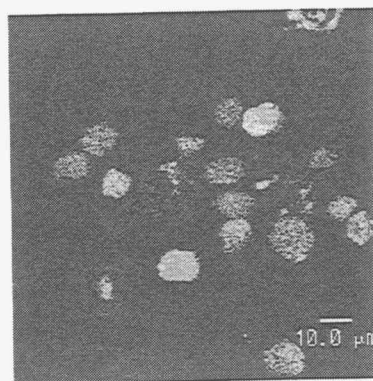
17 β -estradiol によるラジカル制御能

上記の結果より、17 β -estradiol の神経保護作用には細胞内で過剰増加するラジカルレベルの抑制が関与すると推測される。次に、過酸化水素投与による細胞内ラジカルの増加を 17 β -estradiol が抑制するか否かを検討した。細胞内ラジカルの検出は、ラジカルマーカーの 2',7'-dichlorofluorescence diacetate (DCF-DA) の 512 nm の蛍光強度を共焦点顕微鏡下で測定することで行った。DIV9 に 10 μ M の過酸化水素を 10 分間投与すると、DCF の蛍光強度が著しく増加した。これに対し、17 β -estradiol を 24 時間前処置した細胞では、過酸化水素による DCF の蛍光強度の増加が顕著に抑制された (図 2-7)。

A



B



この 17β -estradiol のラジカル増加抑制作用が、 17β -estradiol がラジカルと直接反応して減少させることに起因するかを検討するために、無細胞系で過酸化水素による DCF-DA の蛍光強度に与える 17β -estradiol の影響を検討した。リン酸緩衝液中で $100\ \mu\text{M}$ DCF-DA と $100\ \mu\text{M}$ 過酸化水素を反応させ、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定したところ著しい蛍光強度増加が観測された。この過酸化水素による蛍光強度の増加は $10\ \text{U/ml}$ の catalase を過酸化水素と混合することにより著明に抑制された。しかし、 17β -estradiol (1 - $100\ \mu\text{M}$) を過酸化水素と混合しても過酸化水素単独時に観測された蛍光強度を有意に抑制しなかった (図 2-8)。

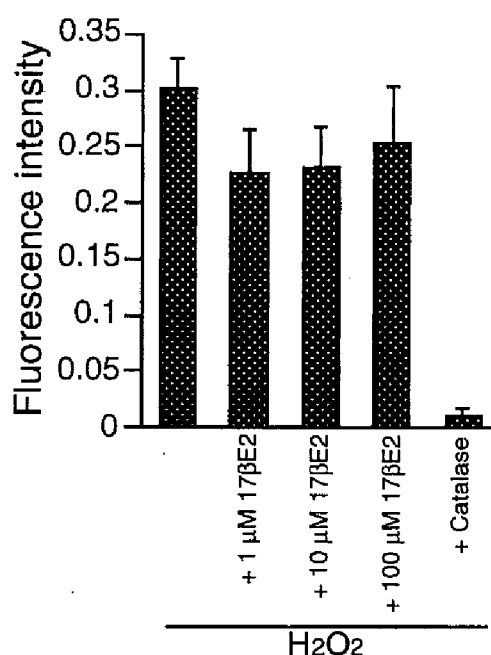


図 2-8 ラジカル除去における 17β -estradiol の直接作用

$100\ \mu\text{M}$ DCF-DA を用いて $100\ \mu\text{M}$ 過酸化水素のラジカルレベルを蛍光強度で示した。 17β -estradiol は過酸化水素と同時に加えた。

図 2-7 過酸化水素投与による細胞内ラジカル増加に対する 17β -estradiol の作用 (前頁)

培養 9 日目に過酸化水素を 10 分間投与し、ラジカルにより発生する DCF 由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で検出した。A は 10 分間の過酸化水素投与による蛍光変化、B は 17β -estradiol を 24 時間前投与した後、過酸化水素を投与した細胞の蛍光変化を示す。

第3節 17 β -estradiol の抗アポトーシス作用

BSO およびブレオマイシン誘発アポトーシスにおける JNK-cJun/AP-1 の関与

本章第1節よりブレオマイシンおよびBSO誘発アポトーシスには caspase-3 の活性化の関与が示唆されたことから、次に caspase-3 下流以降のシグナル伝達の解明を行った。MAP kinase ファミリーの中で c-Jun N-terminal kinase (JNK) がアポトーシス実行に関与することが知られている。図2-9において、BSO 投与による JNK タンパクレベルを western blotting で検出した結果を示す。3 μ M BSO および 10 μ M ブレオマイシンを 24 時間投与することにより JNK1 および JNK2/3 のタンパクレベルが上昇した。このうち JNK2/3 のタンパク増加は Ac-DMQD-CHO で拮抗されたが、JNK1 の増加は抑制されなかった。

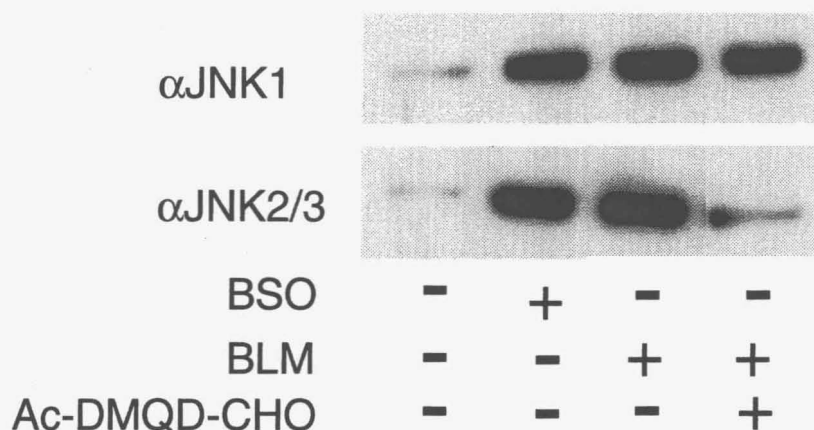


図2-9 BSO またはブレオマイシン (BLM) による JNK タンパク発現誘導

培養8日目にBSOまたはブレオマイシンを24時間投与し、JNKタンパクをwestern blottingで検出した。Ac-DMQD-CHOの投与は、これら神経毒の前投与24時間と同時投与24時間の計48時間を行った。

次に、JNKの活性化によりc-Junを介したAP-1 siteでの活性化がBSO誘発神経細胞死に関与するか否かをc-Jun/AP-1阻害薬のcurcuminを用いて検討した。Curcuminを1時間前投与とBSOまたはブレオマイシンと同時に24時間投与する事によりBSOおよびブレオマイシン誘発神経細胞死は抑制された(図2-10)。しかし、このcurcuminはブレオマイシンによるcaspase-3活性の増強に影響を与えなかった(図2-11)。以上の結果よりBSOとブレオマイシンはcaspase-3の活性化とそれに続くJNKタンパク増加を介したAP-1 siteでの転写活性化が引き起こされることによりアポトーシスが誘発することが示唆された。

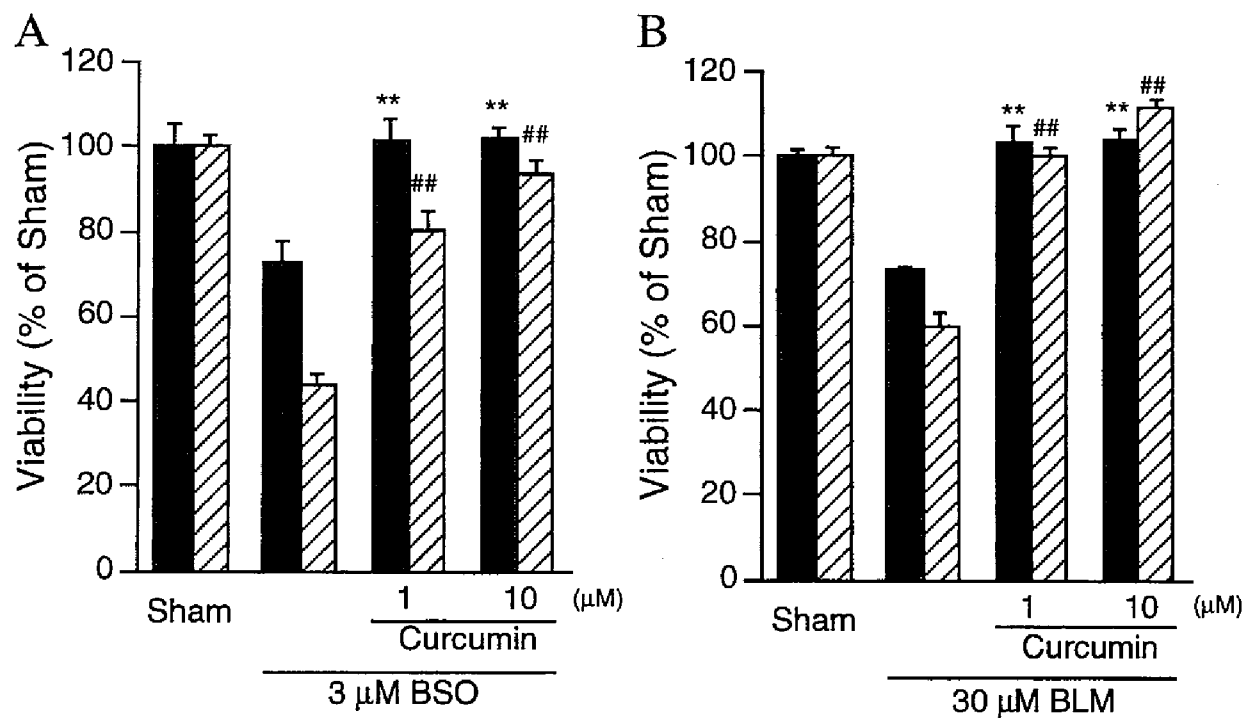


図 2-10 BSO およびブレオマイシン誘発アポトーシスに対する curcumin の作用
Curcumin の投与は、BSO またはブレオマイシン投与前の 1 時間とさらに同時に 24 時間行った。BSO またはブレオマイシンは培養 8 日目に 24 時間投与し、その後薬物不含培地で培養 12 日目までインキュベートした。*** $P < 0.01$ vs. BSO or BLM

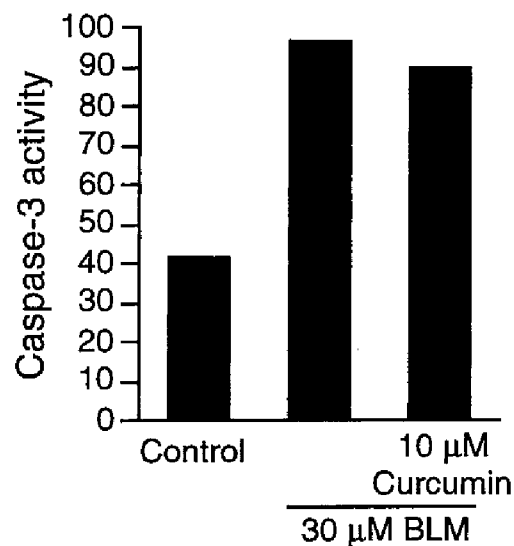


図 2-11 ブレオマイシンによるカスパーゼ 3 の活性化
ブレオマイシンを 6 時間投与した後、カスパーゼ 3 活性を測定した。Curcumin の投与は、ブレオマイシン投与前の 30 分とさらにブレオマイシン投与時の 6 時間、計 6 時間 30 分を行った。

BSO およびブレオマイシン誘発神経毒性に対する 17 β -estradiol の作用

BSO およびブレオマイシン誘発神経毒性に対し、17 β -estradiol が保護作用を示すか否かを検討した。17 β -estradiol を 24 時間前投与および BSO またはブレオマイシンと 24 時間同時投与を行うことにより、両ニューロンにおける神経毒性は濃度に依存して抑制された (図 2-12)。次に、この 17 β -estradiol の保護作用における前投与時間の依存性について検討を行った結果、両ニューロンにおいて前投与時間に依存した神経保護作用を発現した (図 2-13)。

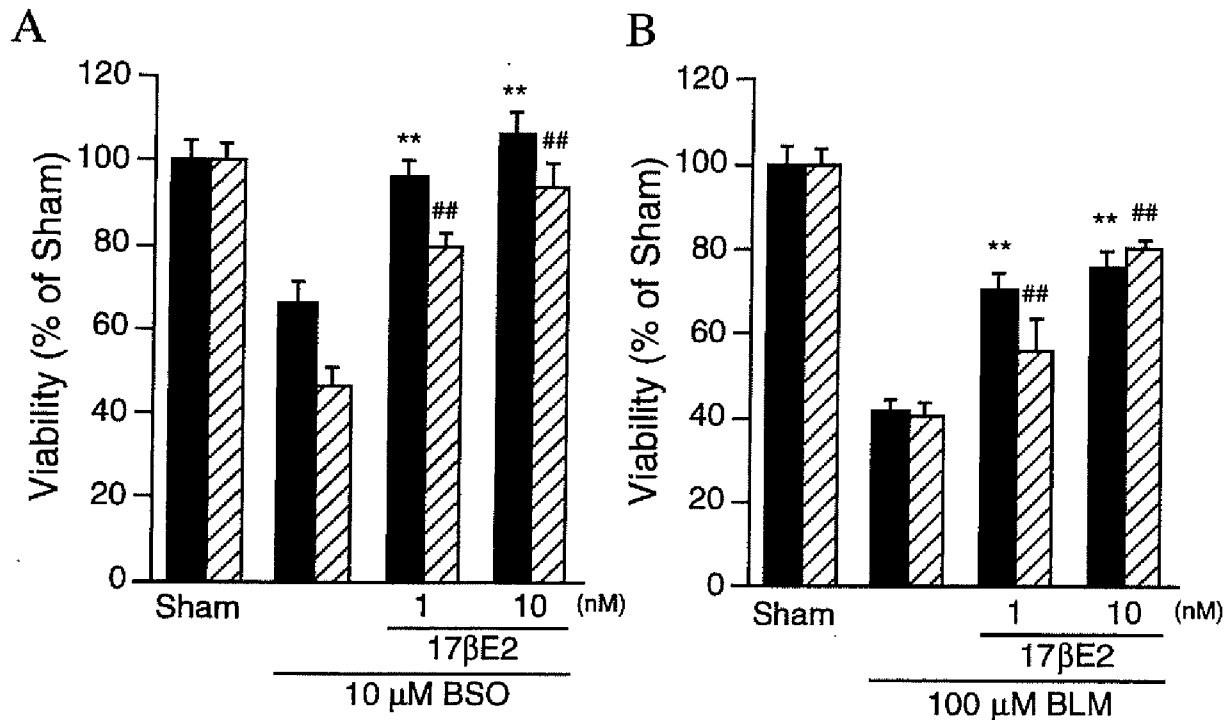
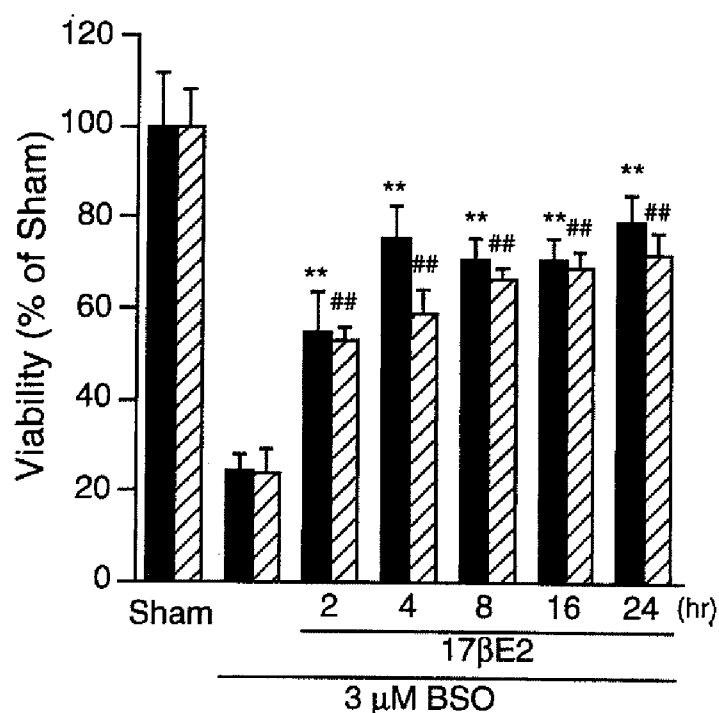


図 2-12 BSO およびブレオマイシン誘発神経毒性に対する 17 β -estradiol の作用
17 β -estradiol の投与は、培養 7 日目に前投与 24 時間と、神経毒と同時に 24 時間、計 48 時間行った。**,## $P < 0.01$ vs. BSO or BLM



さらに17 β -estradiolはBSOによるTUNEL陽性細胞数の増加を抑制することから、抗アポトーシス作用も同時に有することが示唆された(図4-14)。

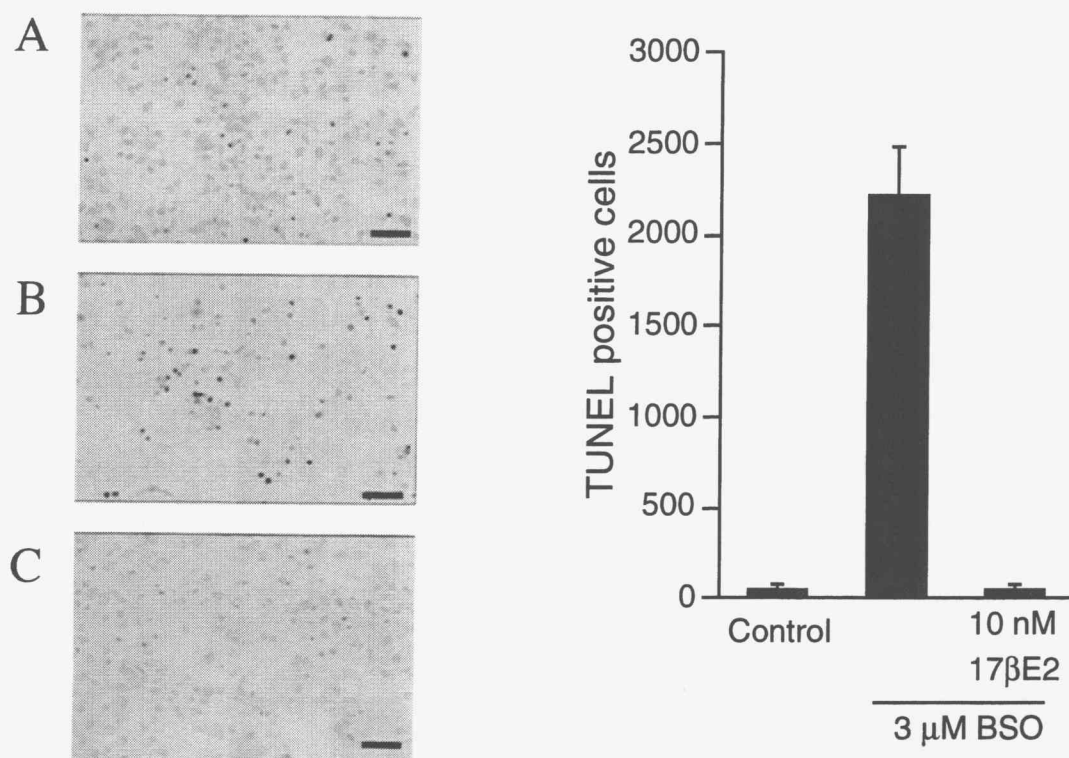


図 2-14 BSO 誘発 TUNEL 陽性細胞数に対する 17 β -estradiol の作用

(A) Sham 処置群、(B) 3 μ M BSO 処置群、(C) 10 nM 17 β -estradiol と 3 μ M BSO 処置群の TUNEL 染色像を示す。培養 8 日目に BSO を 24 時間投与した後、TUNEL 染色を行った。17 β -estradiol は培養 7 日目に前投与 24 時間および、培養 8 日目に BSO と同時に 24 時間、計 48 時間投与した。スケールバーは 100 μ m を示す。

図 2-13 17 β -estradiol の抗アポトーシス作用発現における前投与時間依存性 (前頁)
17 β -estradiol の投与は BSO 投与前のグラフに示す各時間とさらに BSO 投与時の 24 時間行った。*** P < 0.01 vs. BSO

17 β -estradiol の抗アポトーシス作用の機序解明

17 β -estradiol の抗アポトーシス機序の解明を行った。17 β -estradiol がアポトーシス刺激による caspase-3 活性の増大、または JNK タンパクの誘導に影響を与えるか検討したところ、17 β -estradiol は caspase-3 活性および JNK タンパクに影響を与えなかった (図2-15、16)。次に、この神経保護作用がエストロゲン受容体 (ER) を介した作用であるか否かを検討した。ER には ER α と ER β の2つのサブタイプが存在するが、中脳黒質においては ER β が多く存在することが報告されている [35,36,37]。この ER β はホモダイマーを形成して estrogen receptor element で下流遺伝子の転写活性を促進することで、または c-Jun, c-Fos とヘテロトリマーを形成して AP-1 site で下流遺伝子の転写活性を抑制することで作用を発現する [35]。この2つの異なった ER β の転写活性調節のどちらが 17 β -estradiol の神経保護作用に関与するかを ER アンタゴニストの ICI182,780 と ER のホモダイマー形成阻害薬の Yp537 を用いて検討した。ICI182,780 は 17 β -estradiol による保護作用を抑制したが、Yp537 は抑制しなかった (図2-17)。以上の結果より 17 β -estradiol は ER β とホモダイマーを形成して ERE で転写活性の促進を引き起こすのではなく、c-Jun, c-Fos とヘテロトリマーを形成して AP-1 site で転写活性を抑制することにより神経保護作用を発現することが示唆された。

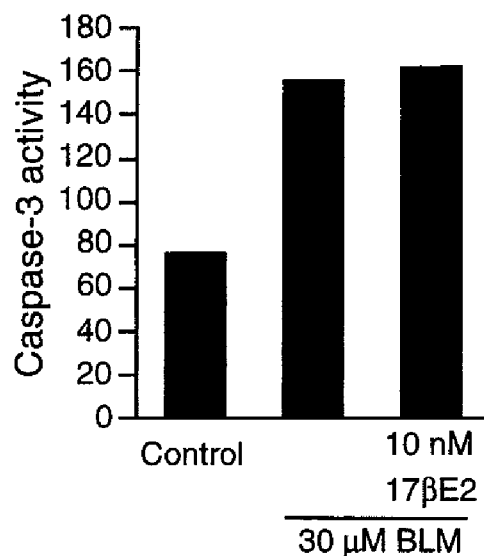


図 2-15 カスパーゼ 3 の活性化に対する 17 β -estradiol の作用

培養 7 日目にブレオマイシンを 6 時間投与した後、caspase-3 活性を測定した。17 β -estradiol はブレオマイシン投与前の 24 時間と同時の 6 時間、計 30 時間投与した。

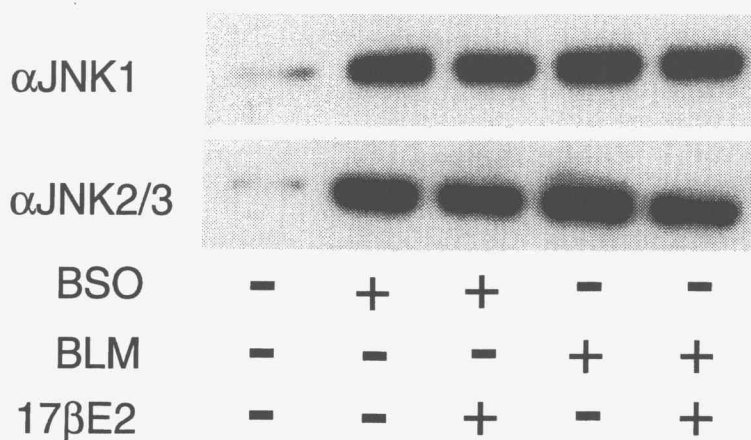


図 2-16 JNK タンパク発現量に対する 17β-estradiol の作用

培養 7 日目に BSO またはブレオマイシンを 24 時間投与し、JNK タンパクを western blotting で検出した。17β-estradiol はこれら神経毒投与前に 24 時間、神経毒と同時に 24 時間、計 48 時間投与した。

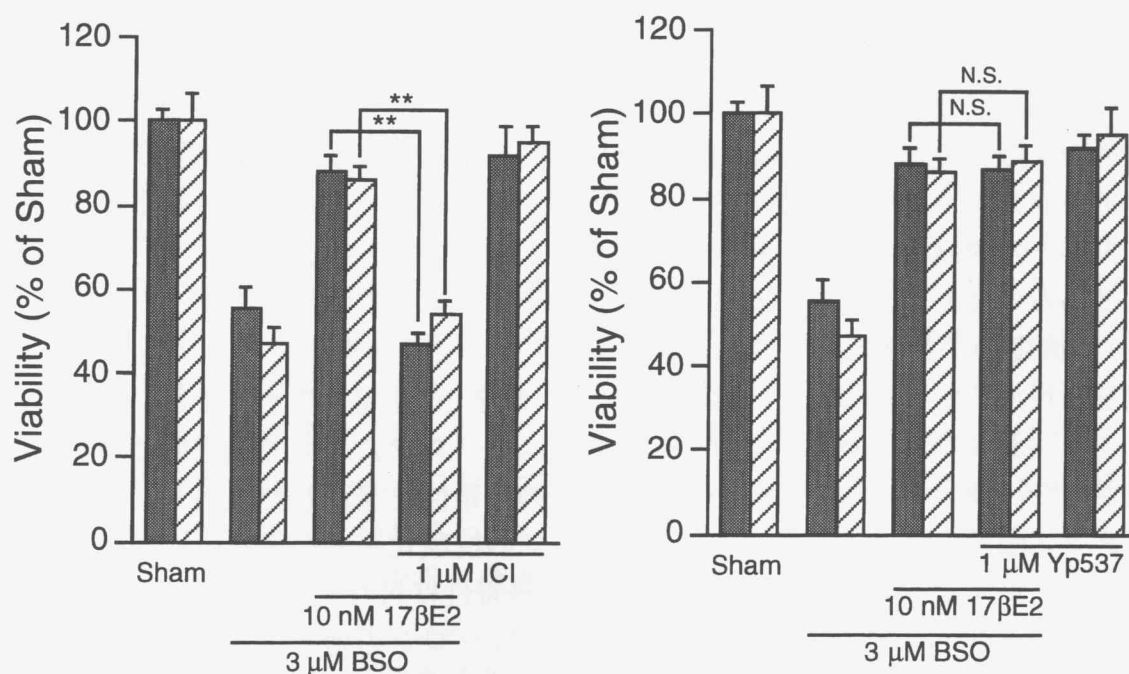


図 2-17 17β-estradiol の抗アポトーシス作用に対する ICI182780 (ICI) および Yp537 の作用

17β-estradiol の投与は、培養 7 日目に BSO 不含培地で 24 時間、さらに培養 8 日目に BSO 含有培地 24 時間行った。ICI182780 および Yp537 は 17β-estradiol 含有培地で 48 時間投与した。** $P < 0.01$, N.S.: not significant

考察

本研究で、 17β -estradiol はネクローシスおよびアポトーシスに対して異なった機序により神経保護作用を示すことが明らかとなった。細胞死は、その過程の違いによりアポトーシスとネクローシスに大別されることが知られている。ネクローシスでは、細胞の膨潤とそれに続く細胞膜の破壊や細胞内容物の漏出が起こるのに対して、アポトーシスはクロマチンの凝集、DNA の断片化、および細胞の萎縮が起こる。このアポトーシスは発生過程で観察される細胞死の形態であったが、近年、成熟ニューロンの細胞死にもアポトーシスが関与する知見が報告されている [38]。 17β -estradiol の保護作用を検討する前に神経毒性を惹起させるグルタミン酸および BSO がどちらの細胞死の形態をとるか検討した。またアポトーシスを誘発させる抗ガン剤のブレオマイシンについても併せて検討を行った。中脳培養細胞に BSO またはブレオマイシンを投与すると、TUNEL 染色による検出される DNA 断片化を有する細胞が確認された。この TUNEL 染色は、アポトーシスによる DNA 断片化 [39] だけでなく、ネクローシスにより傷害を受けた DNA も非選択的に認識する知見が報告されている [40]。しかし、BSO またはブレオマイシン投与により TUNEL 陽性細胞の出現に加えて、Hoechst 染色による核クロマチンの凝集が観察されたこと、さらに caspase-3 阻害薬により両ニューロンの神経毒性が抑制され、ブレオマイシンにより caspase-3 の活性化を引き起こすことを示した。本研究におけるこれらの結果は、形態学および生化学的の両観点 [41] において BSO およびブレオマイシン誘発細胞死がアポトーシスであることを強く支持するものである。一方、高濃度のグルタミン酸を短時間投与した細胞群では、アポトーシス様の核形態変化は観察されず、また caspase 非依存的であることからネクローシスであることが示された。

まず、高濃度のグルタミン酸投与により惹起される神経毒性に対し、 17β -estradiol が保護作用を発現するか検討した。1 mM グルタミン酸を 10 分間投与することによりドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの両ニューロンにおいて同程度の神経細胞死が惹起された。両ニューロンにおいて同程度の神経毒性を発現した原因として、高濃度のグルタミン酸投与により、ドパミンニューロンの抗酸化系の処理能力を超える過剰なラジカル産生が考えられる。このグルタミン酸神経毒性に対して高濃度の 17β -estradiol の前投与はドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの両者において神経保護作用を示したが、cholesterol、testosterone、corticosterone は示さなかった。この結果より、 17β -estradiol のグルタミン酸神経毒性に対する保護作用はステロイド骨格によるものでないことが推定された。以前の報告で、 17β -estradiol は NMDA 受容体に直接抑制することによりラット培養海馬ニューロン死を抑制することや、カルシウムチャネルを介したカルシウム流入を抑制する等の知見が報告されている [42,43]。前者の場合、 17β -estradiol を NMDA と同時に投与した際、NMDA current や NMDA 誘発神経細胞死を抑制することが

示されており、後者においては 17β -estradiol を投与した直後からカルシウム流入抑制作用が観察され、除去すると作用が消失することが示されている。しかし、本研究の結果より、同時投与では保護作用が発現しなかったことから、 17β -estradiol の神経保護作用が NMDA 受容体またはカルシウムチャネルへの直接的な抑制作用が寄与している可能性は低いと考えられる。エストロゲンの作用はエストロゲン受容体 (ER) を介した転写活性を活性化により合成されるタンパクを介して発現することが知られている。予備的実験において 17β -estradiol の保護作用に対する ER アンタゴニストのタモキシフェンの作用の検討を試みたが、 $10\ \mu\text{M}$ 以上のタモキシフェンは細胞毒性を示したことから、アンタゴニストを用いた薬理学的実験により 17β -estradiol の保護作用に ER が関与するか検討できなかった。しかし、本研究で示したように、 17β -estradiol の神経保護作用はタンパク合成阻害薬の cycloheximide により統計学的に有意な抑制作用を示さなかったこと、さらに 17β -estradiol を 60 分間前投与した際でも神経保護作用を示すことから、ER を介した遺伝子レベルでの調節以外の作用が神経保護作用に関与することが示唆される。核の ER 以外に膜に 17β -estradiol の受容体の存在を示唆する知見が報告されており [44]、 17β -estradiol はこの膜受容体を介して遺伝子レベルの調節ではなく、素早く様々な反応を発現する [45]。この膜受容体を介して 17β -estradiol は神経保護作用を発現することを示す知見が報告されており [46,47]、本研究で得られた 17β -estradiol の保護作用も膜受容体を介して発現する可能性が考えられる。 17β -estradiol はグルタミン酸だけでなく XO/HX や H_2O_2 などのラジカル神経毒性に対しても両ニューロンにおいて神経保護作用を示し、さらに 17β -estradiol を 24 時間前投与した細胞では、 H_2O_2 投与による細胞内ラジカルの著しい増加の抑制作用が観察された。これらの結果より、 17β -estradiol の神経保護作用には細胞内ラジカル増加の制御が寄与することが示唆される。一方 17β -estradiol の 3 位の炭素に結合している hydroxyl 基がラジカル除去能を有し、これが神経保護作用に関与することが示唆されている [48]。しかし、無細胞系で 17β -estradiol の H_2O_2 除去能を検討したところ、保護作用を示した $100\ \mu\text{M}$ 17β -estradiol は有意に H_2O_2 を除去しなかったことから、 17β -estradiol が直接ラジカルをトラップして細胞内のラジカル増加を抑制するのではないことが示された。In vivo において高濃度の 17β -estradiol が GPx や SOD 活性を上昇させることが報告された [49] ことから、本研究における 17β -estradiol のラジカル増加抑制作用に、これら抗酸化系を担う酵素の活性化が関与する可能性が考えられる。

次に 17β -estradiol のアポトーシスに対する作用を検討するにあたり、BSO およびプレオマイシン誘発アポトーシスのカスケードを解明を行った。MAP kinase ファミリーの中で c-Jun N-terminal kinase (JNK) がアポトーシス実行に関与することが知られている。BSO またはプレオマイシンを投与することにより JNK1 および JNK2/3 タンパクレベルが増加したが、アポトーシスを抑制する caspase-3 阻害薬の Ac-DMQD-CHO により JNK2/3 のタンパク増加のみが抑制された。この結果より、JNK2/3 がアポトーシスに関与する

ことが示唆される。また抗ガン剤やラジカルによるアポトーシスには JNK の活性化と AP-1 site での転写活性化が必要であることが報告されている [50,51,52]。c-Jun/AP-1 の阻害薬で AP-1 site での転写活性を抑制する curcumin [53] を用いて検討したところ、アポトーシスが抑制された。また curcumin はブレオマイシン投与による caspase-3 活性化を抑制しなかったことから、BSO およびブレオマイシン誘発アポトーシスは、caspase-3 活性化による JNK2/3 タンパクの up-regulation を介して AP-1 site で転写活性を促進することにより誘発することが示唆された。

17 β -estradiol は BSO 誘発ニューロン死に対して濃度および前投与時間に依存した保護作用を示した。また BSO による TUNEL 陽性細胞数の増加を 17 β -estradiol は減少させたことから抗アポトーシス作用も併せて有することが示された。しかし、アポトーシスカスケードに關与する caspase-3 の活性化および JNK2/3 発現増加に対しては 17 β -estradiol は何ら影響を与えなかった。17 β -estradiol の保護作用は ER アンタゴニストの ICI182,780 により抑制された。ER には ER α と ER β の 2 つのサブタイプの存在が確認されているが、中脳黒質においては ER β がほぼ占有的に存在することが報告されている [35,36,37]。これらの知見を考慮すると、17 β -estradiol は ER β を介して保護作用を発現することが示唆される。17 β -estradiol が ER β と結合すると、ER β はホモダイマーを形成して estrogen receptor element で、または c-Jun, c-Fos とヘテロトリマーを形成して AP-1 site で、下流遺伝子の転写活性を調節することにより作用を発現する [35]。ER β ホモダイマー形成阻害薬の Yp537 [54] では 17 β -estradiol の保護作用は抑制されなかったことから、17 β -estradiol は ER β と結合した後、c-Jun, c-Fos とヘテロトリマーを形成し AP-1 site で遺伝子調節を行うことにより神経保護作用を発現することが示唆された。

本研究で、17 β -estradiol はネクローシスおよびアポトーシスに対して異なった機序により保護作用を有することを見いだした。17 β -estradiol はネクローシスに対して *de novo* 合成を介さずに細胞内ラジカルレベルを制御することにより神経保護作用を、またアポトーシスに対してはアポトーシスシグナルによる転写活性化を制御することにより抗アポトーシス作用を発現することが示唆された。

第3章

培養中脳ニューロン死における活性型ビタミンDの神経保護作用

ビタミンDは脂溶性ビタミンで、古くから末梢組織においてカルシウムとリンの代謝平衡維持や骨の形成などの生理作用を有し、このビタミンDの欠乏はくる病や骨軟化症を引き起こすことが報告されている [55,56]。近年、ビタミンDの古典的な生理作用に加えて、T cell または B cell で cytokine や immunoglobulin の産生抑制による免疫調節作用、細胞の増殖や分化調節作用、ガン抑制作用、インスリン分泌促進作用等が報告されている [57,58,59,60]。これらビタミンDの生理作用は25位および1 α 位の炭素がヒドロキシル化された 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25-(OH)₂D₃] である [61]。脳においてビタミンD [62]、ビタミンD受容体 (VDR) [63,64]、や 1 α ,25-(OH)₂D₃ 合成酵素 [65] の存在が確認されることからビタミンDが脳においても何らかの生理作用を示すことが予測される。これを支持する知見として、ラット脳から作製した培養グリア細胞において、1 α ,25-(OH)₂D₃ が NGF、NT4/5、GDNF などの神経栄養因子の産生すると近年報告されており [66,67]、ニューロンの生存維持および分化に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、脳の生理機能における作用および役割に関する詳細については未だ不明である。一方、病理条件下において、アルツハイマー病海馬での VDR mRNA の減少 [68] が、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患において、血清中の 1 α ,25-(OH)₂D₃ レベルの減少 [69] が報告されている。さらに、ビタミンDはパーキンソニズムを改善し、L-DOPA 投与量を減少させることが報告されている [70]。しかし、中脳ドパミンニューロン死とビタミンDの関連については明らかにされていない。そこで、著者は中脳ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性に対する 1 α ,25-(OH)₂D₃ の作用について検討し、その保護作用機序の解明を行った。

実験方法

培養中脳細胞の作製と維持

第1章実験方法に同じ

免疫染色および細胞毒性の評価

生存率を計数するために行った、ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの免疫染色は第1章と同じ実験方法で行った。一方、ニューロンとアストロサイトにおけるビタミンD受容体の存在を検出するために以下の実験方法に基づいた蛍光免疫染色法を

用いた。DIV 8 に 4 % パラホルムアルデヒドで 30 分間固定を行った。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.2 % triton-X で 30 分間膜の可溶化を行い、3 % ウシ血清アルブミン (BSA) でウサギ由来抗 TH 抗体、マウス由来抗 MAP2 抗体、ウサギ由来抗 GFAP 抗体およびラット由来抗ビタミン D 受容体 (VDR) 抗体をそれぞれ 500 倍、400 倍、400 倍、400 倍希釈した一次抗体反応液で 4 °C、一晚反応させた。翌日 PBS で洗浄後、FITC 標識抗ウサギ抗体、FITC 標識抗マウス抗体、および Rhodamine 標識抗ラット抗体を 1 % BSA で 400 倍希釈した二次抗体反応液を室温で 1 時間反応させ、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞を観察した。

ラジカルレベルの測定

ラジカルレベルの測定にはラジカルマーカである 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) を用いた [31]。細胞内ラジカルレベルの測定には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM410, Carl Zeiss) を用いて行った。DIV9 の細胞に 30 μ M DCF-DA を培地中で 30 分間インキュベートすることで DCF-DA を取り込ませ、その後 3 回洗浄を行い 30 μ M H₂O₂ を投与した。一方、無細胞系でのラジカルレベルの測定では、30 μ M DCF-DA を含有するリン酸緩衝液中で蛍光プレートリーダー (Wallac 1420 ARVOsx) を用いて行った。

統計処理

データはすべて Mean \pm S.E.M. で示した。Turkey を用いて検定を行い、危険率が 5% 未満の時、統計学的有意差があると判断した。

実験結果

中脳培養細胞におけるビタミンD受容体の存在

ビタミンDは核に局在するビタミンD受容体(VDR)を介した転写活性を調節することにより様々な作用を発現する。まず、中脳培養細胞においてVDRの存在を免疫染色で確認した。図3-1で示される様に、ドパミンニューロンをはじめとするすべてのニューロンにおいてVDRの存在が確認されたが、アストロサイトではVDRを保持しない細胞が確認された。なおVDRは核に局在していた。

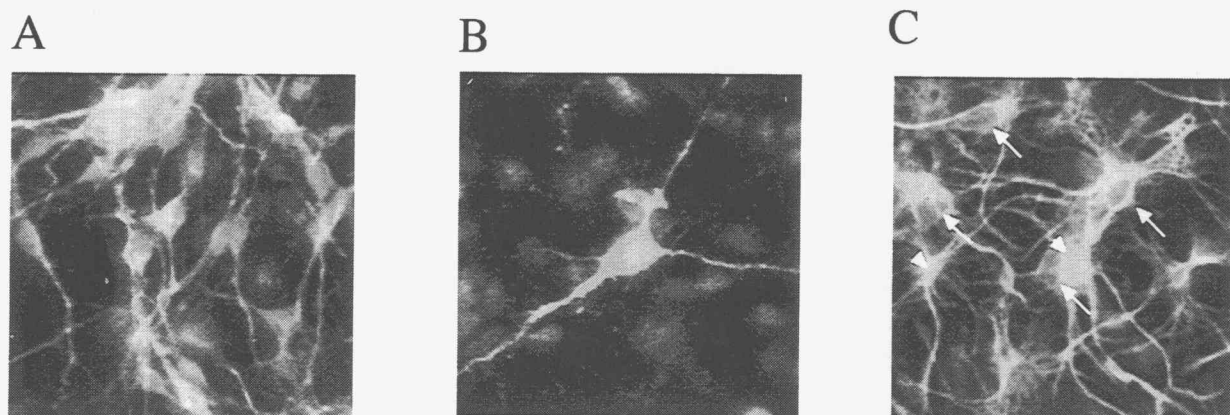


図3-1 ビタミンD受容体の蛍光顕微鏡像

培養8日目に蛍光面液染色を行った。Aにおいてニューロン(緑)とVDR(赤)、Bにおいてドパミンニューロン(緑)とVDR(赤)、Cにおいてアストロサイト(緑)とVDR(赤)の二重蛍光染色像を示す。矢印はVDRを発現しているアストロサイトを、矢じりはVDRを発現していないアストロサイトを示す。スケールバーは50 μm を示す。

グルタミン酸神経毒性に対するビタミンD代謝産物の作用

ビタミンDは肝臓で25-位の炭素が水酸化されて25-hydroxyvitamin D₃ (25-OHD₃)に、さらに腎臓で1 α -位または24-位の炭素が水酸化されて1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25-(OH)₂D₃] および24,25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25-(OH)₂D₃] に代謝される。これらビタミンD代謝産物がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示すか否かを検討した。DIV 9に1 mM グルタミン酸を10分間投与することにより、ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの両ニューロンで細胞死が惹起された。DIV 8にビタミンD類縁体を24時間前投与したところ、25-OHD₃、24,25-(OH)₂D₃は保護作用を示さなかったが、1 α ,25-(OH)₂D₃は両ニューロンにおいてグルタミン酸神経毒性を濃度依存的に抑制し、10 nM以上で有意な保護作用を示した(図3-2)。

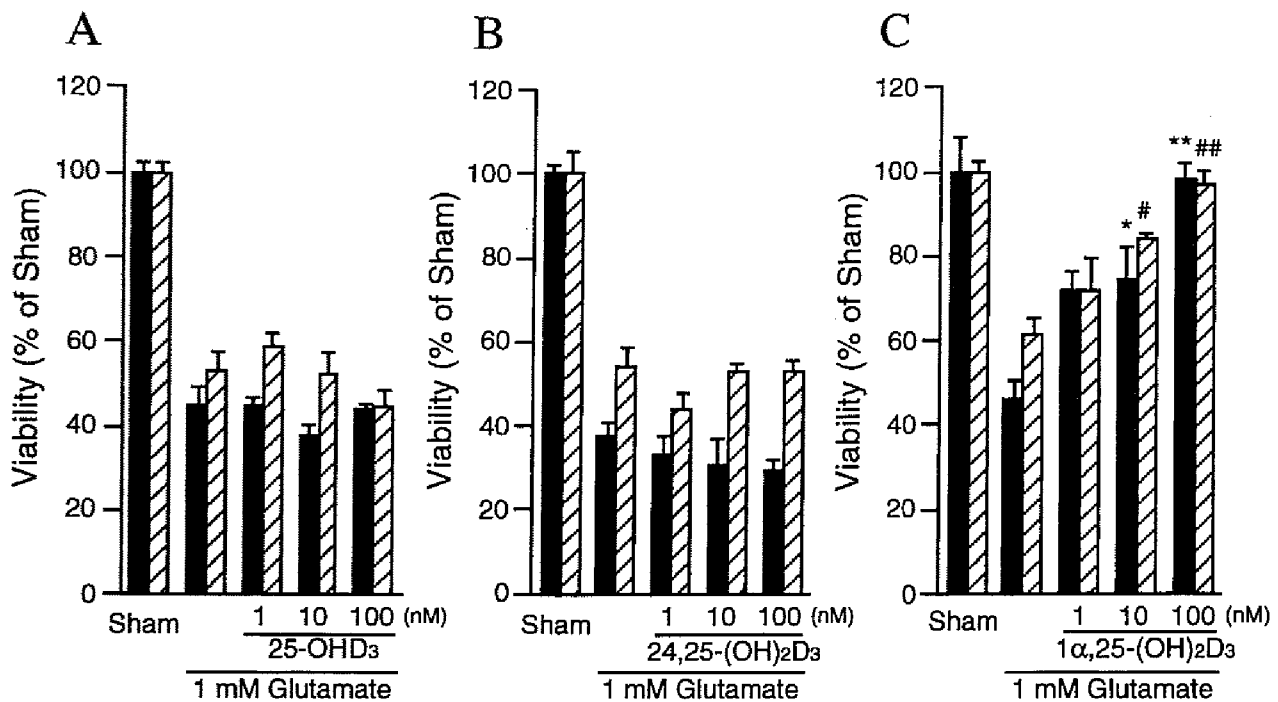


図 3-2 ビタミンD代謝産物のグルタミン酸神経毒性に対する作用

培養9日目にグルタミン酸の10分間投与を行った。25-hydroxyvitamin D₃ (25-OHD₃)、1α,25-dihydroxyvitamin D₃ [1α,25-(OH)₂D₃]、24,25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25-(OH)₂D₃]の投与は、グルタミン酸投与前の24時間行った。グルタミン酸投与後、グルタミン酸不含培地で72時間インキュベートした。**P* < 0.05 vs. Glu, ***P* < 0.01 vs. Glu

次に1α,25-(OH)₂D₃の保護作用における前投与時間の依存性を検討した。1α,25-(OH)₂D₃は前投与時間に依存して両ニューロンのグルタミン酸神経毒性を抑制し、1α,25-(OH)₂D₃を8時間前投与することにより、両ニューロンにおいて有意な保護作用が示された(図3-3A)。しかし、グルタミン酸と同時に1α,25-(OH)₂D₃を投与した場合には保護作用は観察されなかった(図3-3B)。

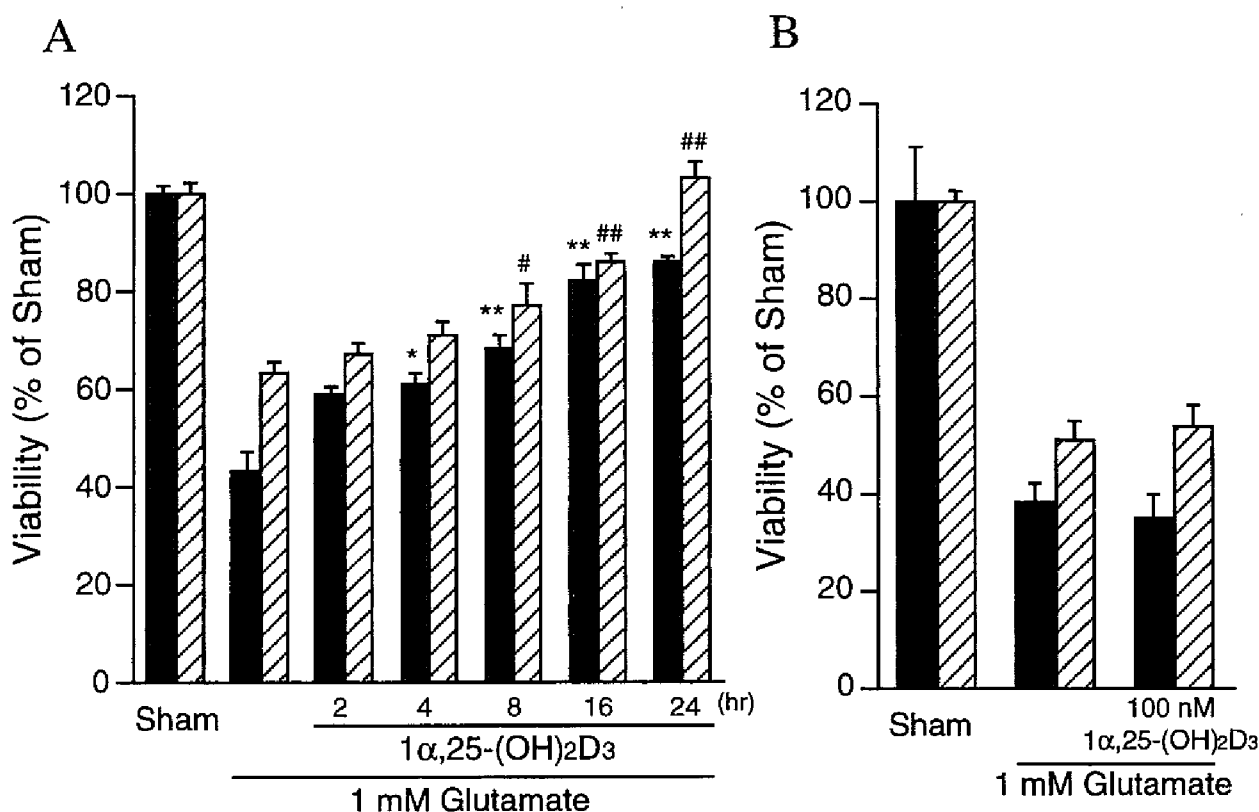


図 3-3 活性型ビタミン D [$1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$] の神経保護作用の前投与時間依存性
 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与はグルタミン酸投与前に各時間 (A) またはグルタミン酸と同時 (B) に行った。* $P < 0.05$ vs. Glu, ** $P < 0.01$ vs. Glu

活性型ビタミン D の保護作用における *de novo* 合成の関与

グルタミン酸神経毒性に対する $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の保護作用は前投与時間に依存し、さらにグルタミン酸との同時投与では発現しなかったことから、*de novo* 合成促進が保護作用に関与することが示唆された。そこで $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の保護作用に対する RNA 合成阻害薬の actinomycin D およびタンパク合成阻害薬の cycloheximide の作用について検討を行った。1 nM の actinomycin D または 0.3 μM の cycloheximide を $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ と同時に 24 時間投与したところ、 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の保護作用は拮抗された (図 3-4)。これらの結果は $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の保護作用発現に *de novo* 合成の関与を示唆するものである。

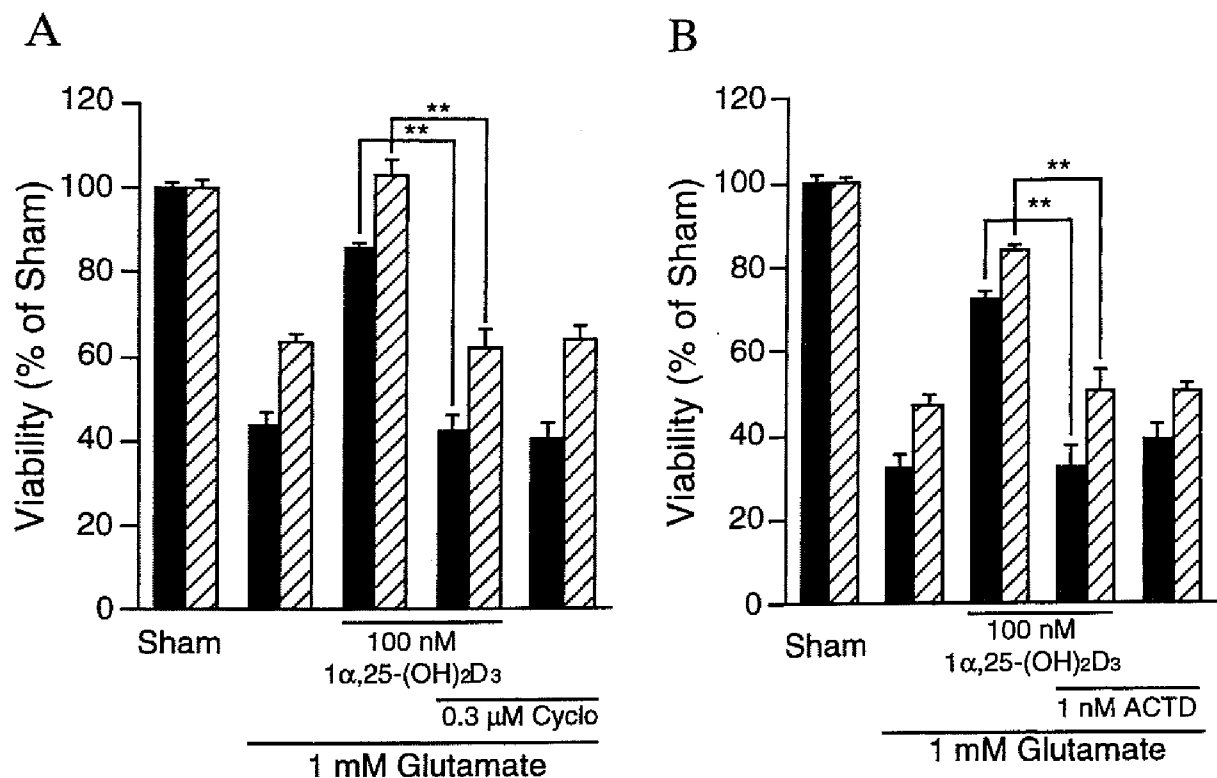


図 3-4 活性型ビタミンDの神経保護作用における *de novo* 合成の関与
RNA 合成阻害薬の actinomycin D (ACTD) およびタンパク合成阻害薬の cycloheximide (cyclo) の投与は $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ 含有培地中で 24 時間行った。 $**P < 0.01$

カルシウムイオノフォア誘発神経毒性に対する活性型ビタミンDの作用

中脳培養ニューロンにおいて、高濃度グルタミン酸の短時間投与で惹起されるニューロン死の機序は詳細に解明されている。すなわち、グルタミン酸が受容体の NMDA 受容体を刺激することにより、NMDA 受容体を介したカルシウムの流入と細胞内でのラジカルの過剰産生によりニューロン死が惹起される。そこで、グルタミン酸神経毒性に対する $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ の保護作用機序の解明を行うために、まずはカルシウムを強制的に細胞内へ流入させるカルシウムイオノフォアにより惹起される神経毒性に対する $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ の作用について検討を行った。DIV 9 にカルシウムイオノフォアの A23187 (1 μM) を 10 分間投与することにより、両ニューロンにおいて細胞死が観察された。この A23187 誘発神経毒性に対して $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ を 24 時間前投与することにより両ニューロンを濃度依存的に保護し、10 nM 以上の $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ で有意な保護作用が観察された (図 3-5)。

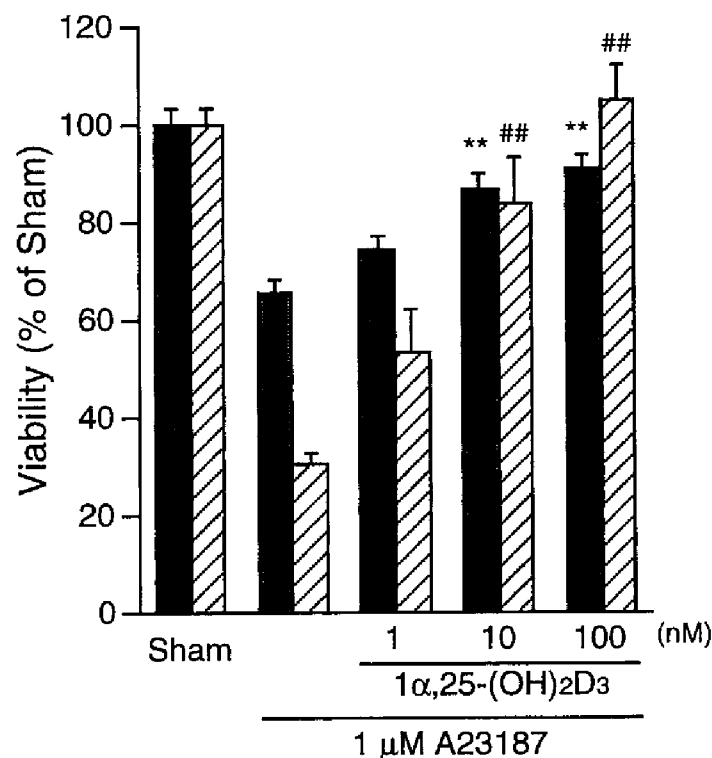


図 3-5 カルシウムイオノフォア誘発神経毒性に対する活性型ビタミンDの作用
 培養9日目に培養中脳細胞をA23187で10分間処置した。1α,25-(OH)2D3の投与は、A23187投与前に24時間グルタミン酸不含培地中で行った。*** $P < 0.01$ vs. A23187

ラジカル誘発神経毒性に対する活性型ビタミンDの作用

次に、ラジカル誘発神経毒性に対する1α,25-(OH)2D3の作用を検討した。培養9日目にxanthine oxidaseとhypoxanthine oxidaseの混合物または過酸化水素を10分間投与することにより両ニューロンにおいて細胞死が惹起された。このラジカル誘発神経毒性に対して1α,25-(OH)2D3を24時間前投与することにより両ニューロンを保護した(図3-6)。しかし、1α,25-(OH)2D3を過酸化水素と同時に投与した場合では、両ニューロンにおいて保護作用は観察されなかった(表3-1)。

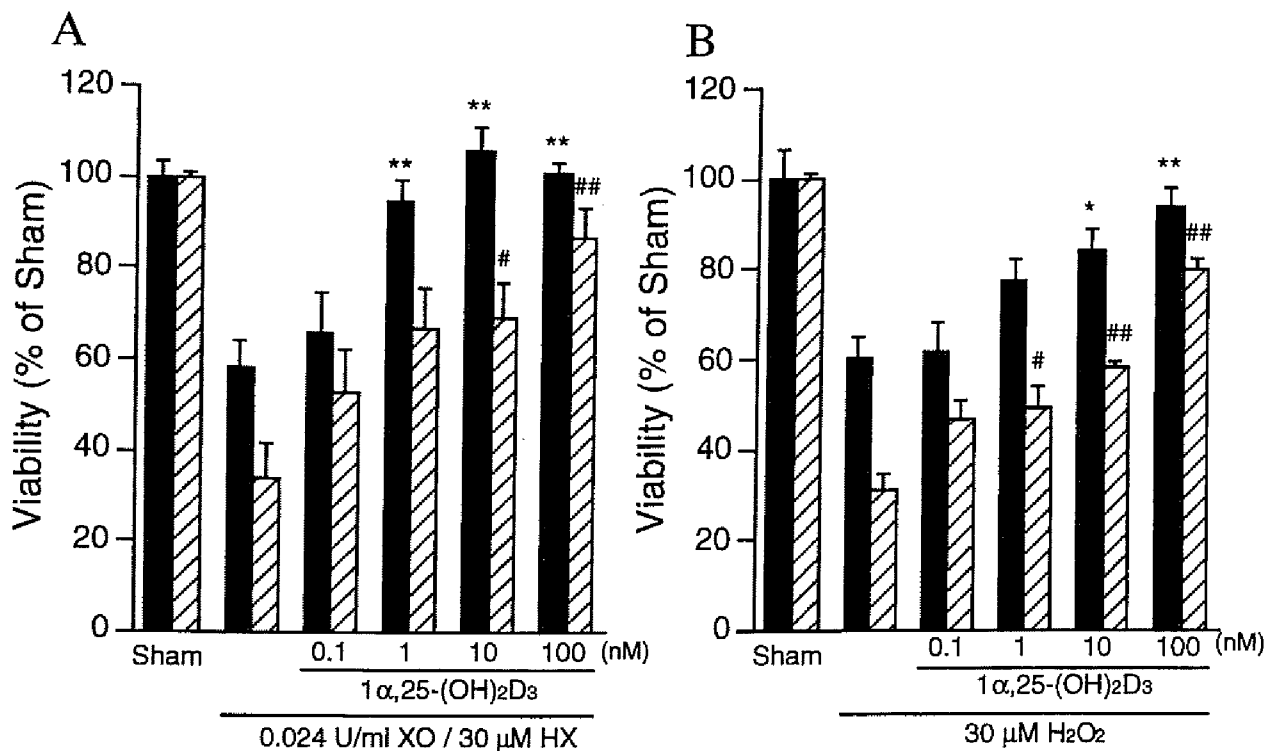


図 3-6 ラジカル誘発神経毒性に対する活性型ビタミンDの作用
培養9日目に中脳培養細胞を XO/HX (A) または過酸化水素 (B) で 10 分間処置した。 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ の投与は、ラジカル投与前の 24 時間これら不含培地中で行った。* $P < 0.05$ vs. XO/HX or H_2O_2 , ** $P < 0.01$ vs. XO/HX or H_2O_2

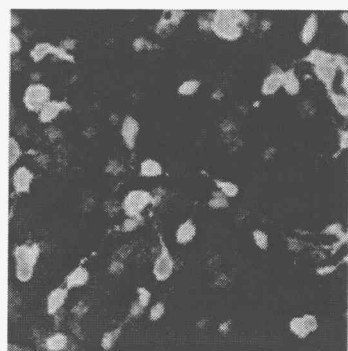
表 3-1 グルタミン酸神経毒性における活性型ビタミンDの同時投与による作用

	Dopaminergic neurons	Non-dopaminergic neurons
	viability (% of sham)	viability (% of sham)
Sham	100 ± 3.5	100 ± 1.6
30 μ M H_2O_2	60.8 ± 6.5	46.0 ± 1.8
+ 1 nM $1\alpha,25-(OH)_2D_3$	56.5 ± 5.0	53.0 ± 4.0
+ 10 nM $1\alpha,25-(OH)_2D_3$	63.5 ± 4.3	50.6 ± 7.0
+ 100 nM $1\alpha,25-(OH)_2D_3$	64.3 ± 1.0	50.6 ± 2.6

活性型ビタミンDによる細胞内ラジカルレベルの調節

ラジカル神経毒性に対して $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ の前投与は保護作用を示したことから、ラジカル投与後の細胞内ラジカルを減少することがこの保護作用機序に関与すると考えられる。そこで、 H_2O_2 投与による細胞内ラジカルレベルへの $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ の作用について検討を行った。 H_2O_2 を投与すると細胞内ラジカルレベルが著明に増加した。 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ を 24 時間前投与することにより、細胞内ラジカルの増加を抑制した (図 3-7)。次に $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ 自身によるラジカル除去作用を無細胞系で検討した結果、 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ 自身にはラジカル除去作用は認められなかった (表 3-2)。

A



B

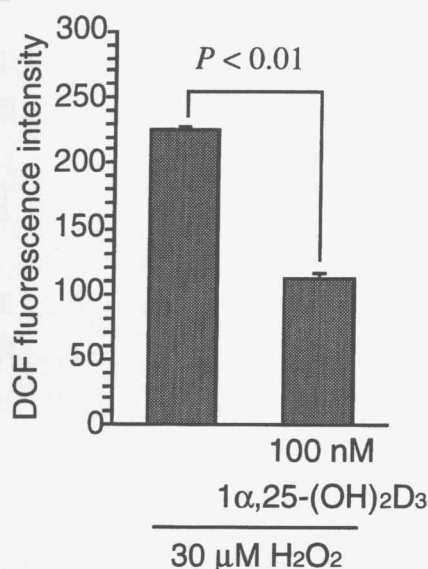


図 3-7 過酸化水素投与による細胞内ラジカル増加に対する活性型ビタミンDの作用
培養 9 日目に過酸化水素を 10 分間投与し、DCF (30 μM) の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で検出した。A の左は 30 μM 過酸化水素投与による蛍光変化、右は 100 nM 1α,25-(OH)₂D₃ を 24 時間前投与した後、過酸化水素を投与した時の蛍光変化。スケールバーは 100 μm を示す。

表 3-2 DCF-DA との相互作用およびラジカル除去作用に対する活性型ビタミンDの作用

Fluorescence intensity ± S.E.M.	
30 μM H ₂ O ₂	210 ± 20
+ 0.1 nM 1α,25-(OH) ₂ D ₃	192 ± 6
+ 1 nM 1α,25-(OH) ₂ D ₃	207 ± 16
+ 10 nM 1α,25-(OH) ₂ D ₃	202 ± 10
+ 100 nM 1α,25-(OH) ₂ D ₃	213 ± 20

30 μM DCF-DA と各濃度の 1α,25-(OH)₂D₃ を含有する反応液中に 30 μM 過酸化水素を加えて 30 分後に DCF-DA の蛍光を測定した。

MPP⁺ および 6-OHDA 誘発神経毒性に対する活性型ビタミンDの作用

以上の結果より、細胞内ラジカルレベルの上昇を抑制することによりグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現ことが示唆された。次に MPP⁺ および 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死に対する作用について検討した。これら薬物はドパミントランスポーターを介してドパミンニューロンに選択的に取り込まれた後、細胞内で代謝、分解されて産生されるラジカルによりドパミンニューロン死を惹起する。MPP⁺ および 6-OHDA を DIV9 に 24 時間投与することによりドパミンニューロンの生存率が著明に減少した。しかし、1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ を 24 時間前投与し、さらにこれら神経毒と同時に 24 時間投与すると、ドパミンニューロン死を濃度依存的に抑制し、100 nM 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ はドパミンニューロンにおいて MPP⁺ および 6-OHDA 誘発神経毒性から有意な神経保護作用を示した (図 3-9)。

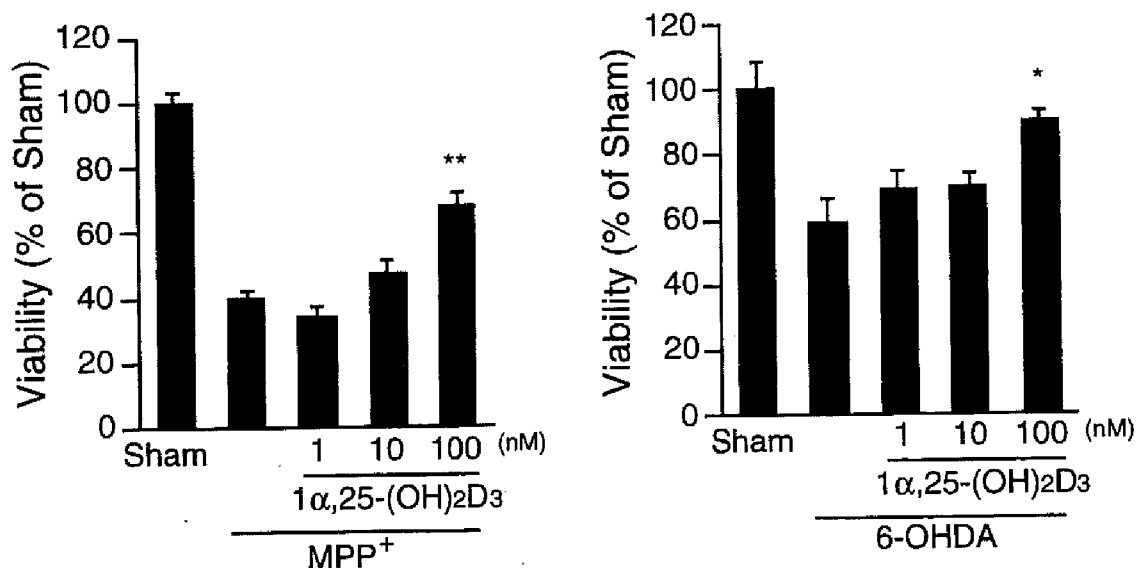


図 3-9 ドパミン神経毒誘発神経毒性に対する活性型ビタミンDの作用

培養 9 日目に MPP⁺ (30 μ M) または 6-hydroxydopamine (30 μ M) を 24 時間投与した。1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ の投与は培養 8 日目にこれらドパミン神経毒不含培地中で 24 時間と、さらに培養 9 日目にドパミン神経毒含有培地で 24 時間、計 48 時間行った。* P < 0.05 vs. 6-OHDA, ** P < 0.01 vs. MPP⁺

考察

ビタミンDはコレステロールから合成される脂溶性ビタミンであり、肝臓で、25位の炭素が水酸化を受け 25-hydroxyvitamin D₃ (25-OHD₃) に代謝され、この 25-OHD₃ が腎臓で 24位の炭素および 1位の炭素が水酸化されて 24, 25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25-(OH)₂D₃] または 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25-(OH)₂D₃] が合成される。この 1 α ,25-(OH)₂D₃ が生理活性物質として古くからミネラルの調節などを行ってきた。本研究は中脳培養細胞においてビタミンDの代謝産物の中で 25-OHD₃ や 24,25-(OH)₂D₃ の前投与ではなく、活性代謝産物の 1 α ,25-(OH)₂D₃ の前投与のみがグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示した。

本研究で用いた培養中脳細胞において、核に局在するビタミンD受容体 (VDR) の存在を免疫染色により検討したところ、ドパミンニューロンを含むすべてのニューロンにおいて VDR の存在が確認されたが、アストロサイトでは VDR を保有しないものも存在した。以前の報告で、VDR の発現は細胞の分化状態に大きく依存することが報告されており [71]、アストロサイトにおける VDR の発現の違いは細胞の分化状態に依存することが推測される。

1 α ,25-(OH)₂D₃ は B 環が解裂した seco steroid で C6-C7 の変形により立体異性体を獲得する。このうち 6-trans 異性体は核受容体を介さない素早い反応を、6-cis 異性体は核受容体を介した転写活性化を引き起こすことが報告されている [72]。

このうち 1 α ,25-(OH)₂D₃ の素早い反応を引き起こすことが想定されている膜受容体 (VDRm) の脳での存在がその特異抗体を用いた免疫染色により確認されている [73]。1 α ,25-(OH)₂D₃ は VDRm を介し、PKC を介したカルシウム流入、mitogen activated protein kinase (MAPK) や Akt を活性化することが報告されている [74,75,76]。予備的研究において、ニューロンの生存維持や保護作用発現に寄与する MAPK および Akt [77,78] に着目し、これら kinase における 1 α ,25-(OH)₂D₃ の作用を検討したところ、1 α ,25-(OH)₂D₃ が MAPK および Akt を活性化させることを western blotting で確認したが、MAPK を活性化する MAPKK の阻害薬 (PD98059) または Akt を活性化する PI3-kinase の阻害薬 (LY294002) では 1 α ,25-(OH)₂D₃ の保護作用は抑制されなかった。このことは 1 α ,25-(OH)₂D₃ の保護作用発現には VDRm を介した生存シグナルが関与しないことを示唆するものである。

膜受容体を介した作用とは別に 1 α ,25-(OH)₂D₃ は核受容体を介して遺伝子レベルで作用発現を調節する。すなわち、1 α ,25-(OH)₂D₃ と結合した VDR が Retinoid X receptor (RXR) と結合し、このヘテロダイマーが DNA 上の vitamin D response element (VDRE) に作用することで、下流遺伝子の転写活性の制御を行う。本研究においてビタミンDの代謝産物の中で VDR を介した転写活性が強い 1 α ,25-(OH)₂D₃ のみが保護作用を示したこと、およびこの保護作用は RNA およびタンパク合成阻害薬により抑制されたことから VDR

を介した *de novo* 合成の促進により保護作用が発現すると示唆される。

In vitro において、 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ はグリア細胞に作用し nerve growth factor (NGF)、NT3 の発現を上昇することが報告されている [66,67]。しかし、予備的実験では、これら栄養因子は中脳培養ニューロンをグルタミン酸神経毒性から保護しなかった。近年 *in vivo* において、 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ が脳虚血による大脳皮質の梗塞面積およびニューロン死を抑制し、これに GDNF の up-regulation が関与することを示唆する興味深い知見が報告された [79]。しかし、GDNF は BSO またはプレオマイシン誘発アポトーシスを抑制するが、グルタミン酸神経毒性を抑制しないことを著者らは報告した [78]。これらの結果は $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ により発現誘導を受ける neurotrophins は、本研究で示されたグルタミン酸神経毒性に対する保護作用に関与しないと考えられる。

以前、当研究室において、中脳ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性の発現に NMDA 受容体の活性化による細胞内へのカルシウム流入とそれに続いてラジカルの過剰産生が関与することを報告した。そこで、グルタミン酸神経毒性に対する保護作用機序の解明を行うため、カルシウムイオノフォアおよびラジカル誘発神経毒性に対する $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を検討した。 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の前投与は A23187 誘発神経毒性に対し両ニューロンにおいて濃度依存的な保護作用を発現した。 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ は細胞内の遊離カルシウム濃度の調節に関与するカルシウム結合タンパクの calbindin D28K を増加させることが脊髄ニューロンで報告されている [80]。この calbindin-D28K の過剰発現は、大脳皮質培養ニューロンにおいて低濃度のカルシウムイオノフォアや NMDA の投与により惹起される神経毒性に対し、保護作用を発現することが報告されている [81,82,83]。本研究の予備実験において $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ が calbindin-D28K タンパクを約 2 倍増加させることを確認している。しかし、この calbindin-D28K の増加が、高濃度のグルタミン酸を投与した際に生じる細胞内の遊離カルシウム量をグルタミン酸神経毒性が発現しないカルシウムレベルまで減少させるかは本研究で明らかにすることはできなかった。よって、現時点でグルタミン酸神経毒性に対する $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の保護作用に calbindin-D28K の増加が関与するかは不明である。

$1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ はグルタミン酸およびカルシウムイオノフォア誘発神経毒性のみならず、ラジカル誘発神経毒性に対しても保護作用を示し、さらに過酸化水素投与による細胞内ラジカル増加を抑制した。この抑制作用は $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 自身による DCF への直接的な相互作用や、過酸化水素の除去作用によるものではないことから、VDR を介してラジカルレベルを制御する機能分子の *de novo* 合成促進が細胞内ラジカルレベルの減少と保護作用に関与すると考えられる。抗酸化作用を有する内在性物質を $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ が増加させることが報告されている。ラットアストロサイトで $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ が γ -glutamyl transpeptidase 合成促進を介してグルタチオンを増加させることが報告されている [84]。しかし予備的実験において 1-100 nM の $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ はグルタチオン量を増加させなかったことより、本研究で得られた保護作用の一因にグルタチオン量の増加が関与しないと考えられる。一方、monocyte において $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ が thioredoxin と thioredoxin reductase

の mRNA とタンパクレベルを増加させることが報告されている [85]。この thioredoxin/thioredoxin reductase 系は、SOD/catalase 系や glutathione/glutathione peroxidase に匹敵する重要な抗酸化系である。近年、この thioredoxin の増加は神経保護作用を呈することが示された [86]。また keratinocyte において $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ は特に hydroxyl radical に強い抗酸化作用を示す metallothionein のタンパク増加を引き起こす [87]。この metallothionein はその抗酸化作用により脳虚血やグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を有することを示す知見が報告されている [88,89]。本研究で示された $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ のグルタミン酸神経毒性に対する保護作用に、グルタチオンを除く上記に示した抗酸化作用を有する分子の合成促進が関与すると考えられる。

$1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ はドパミン神経毒の MPP⁺ および 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死に対しても濃度に依存した保護作用を示した。MPP⁺ および 6-OHDA はドパミントランスポーターを介して選択的にドパミンニューロンに取り込まれた後、それぞれミトコンドリア complex I の活性低下および自動酸化によりドパミンニューロン内で過剰なラジカル産生を誘発することでドパミンニューロン死を惹起する。 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ のこれらドパミン神経毒誘発ドパミンニューロン死の抑制作用に細胞内でのラジカルレベルの増加を抑制することが関与することが示唆される。

以上の結果より、活性型ビタミン D の $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ はグルタミン酸神経毒性およびドパミン神経毒誘発ニューロン死に対して保護作用を発現することを示し、その機序には細胞内のラジカルレベルを制御する機能分子の *de novo* 合成促進が関与することが示唆された。このことはラジカルストレスがドパミンニューロン死においてラジカルストレスの関与が示唆されるパーキンソン病に対して活性型ビタミン D が有効な予防あるいは治療薬となる可能性を示唆する。

総括および結論

著者は、*in vitro* 初代培養中脳細胞系を用いて、ドパミンニューロン死の機序の解明および保護作用活性を有する内在性物質の探索とその保護作用機序の解明を行った結果、以下の新知見を得た。

ラット胎仔由来初代培養中脳細胞に低濃度グルタミン酸または NO ドナーの長時間投与は非ドパミンニューロンにおいて神経細胞死を惹起したが、ドパミンニューロンはこれら神経毒性に対して抵抗性を示した。しかし、グルタチオン枯渇下では、ドパミンニューロンにおいてグルタミン酸および NO 神経毒性が惹起され、その作用には細胞内の遊離鉄が関与することを見出した。

培養中脳細胞において、グルタチオン枯渇薬の BSO および抗ガン剤のブレオマイシンの長時間投与により、Hoechst 染色で核クロマチンの凝集と TUNEL 染色で DNA の断片化等のアポトーシス様の核形態変化と、caspase-3 の活性化を伴った細胞死が惹起された。一方、高濃度のグルタミン酸の短時間投与により、アポトーシス様の核形態変化および酵素の活性化を伴わずに細胞死を惹起した。17 β -estradiol は、高濃度のグルタミン酸により誘発されるネクローシスに対して、*de novo* 合成を介さず細胞内ラジカルレベルを調節することにより保護作用を示した。一方、BSO 誘発アポトーシスに対しては、転写活性を制御することにより保護作用を示した。これらの結果は、17 β -estradiol はネクローシスおよびアポトーシスに対して、異なる作用機序により保護作用を示すことを示唆する。

ビタミン D の活性代謝産物の 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ は、高濃度グルタミン酸およびドパミン神経毒誘発神経毒性に対して保護作用を発現した。また、1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ は過酸化水素による細胞内ラジカルレベルの増加を抑制した。これらの結果は、1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ の保護作用には細胞内ラジカルを制御する機能分子の *de novo* 合成の促進が重要な役割を果たすことを示唆する。

本研究の結果は、パーキンソン病のドパミンニューロン死の機序解明に対する有用な知見となるとともに、パーキンソン病の予防・治療において重要な基礎的資料を提供するものである。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 赤池 昭紀 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益なご助言をいただいた京都大学大学院医学研究科 澤田 秀幸 助手に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言をいただきました京都大学大学院薬学研究科 佐藤 公道 教授、金子 周司 助教授、香月 博志 助教授、南 雅文 助教授、久米 利明 助手、中川 貴之 助手、並びに、京都大学大学院医学研究科 下濱 俊 講師に深く感謝いたします。

本研究にご協力をいただきました中西 美樹 学士、並びに、作花 範子 氏に深く感謝いたします。

発表論文目録

本研究内容の大部分は以下の論文に公表した。

- 1) Ibi, M., Sawada, H., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Shimohama, S., and Akaike, A.
Depletion of intracellular glutathione increases susceptibility to nitric oxide in mesencephalic dopaminergic neurons.
Journal of Neurochemistry 73 (1999) 1696-1703
- 2) Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., Kimura, J., and Shimohama, S.
Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: Mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress.
Annals of Neurology 44 (1998) 110-119
- 3) Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., Kimura, J., and Shimohama, S.
Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death.
Journal of Neuroscience Research 54 (1998) 707-719
- 4) Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Honda, K., Nakanishi, M., Akaike, A., and Shimohama, S.
Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons.
FASEB Journal 14 (2000) 1202-1214
- 5) Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Nakanishi, M., Akaike, A., and Shimohama, S.
Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons.
Journal of Neurochemistry 74 (2000) 1175-1184
- 6) Ibi, M., Sawada, H., Nakanishi, M., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Shimohama, S., and Akaike, A.
Protective effects of $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture.
Neuropharmacology 印刷中

参考文献

1. Graham, D.G.
Mol. Pharmacol. 14, 633-643, 1978
2. Cohen, G.
J. Neural. Transm. Suppl. 32, 229-238, 1990
3. Parker, WD Jr., Boyson, S.J. and Parks, J. K.
Ann. Neurol. 26, 719-723, 1989
4. Perry, T.L. and Young, W.W.
Neurosci. Lett. 67, 269-274, 1986
5. Ambani, L.M., van Woert, M.H. and Murphy, S.
Arch. Neurol. 32, 114-118, 1975
6. Dexter D.T., Wells, F.R., Agid, F., Agid, Y., Lees, A.J., Jenner, P. and Marsden, C.D.
Lancet 2, 120-122, 1987
7. Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. and Marsden, C.D.
Ann. Neurol. 36, 348-355, 1994
8. Blandini, F., Porter, R.H. and Greenamyre, J.T.
Mol. Neurobiol. 12, 73-94, 1996
9. Akaike, A., Tamura, Y., Terada, K. and Nakata, N.
Prog. Brain Res. 103, 391-403, 1994
10. Jenner, P. and Olanow, W.
Neurology 47, S161-S170, 1998
11. Griffith, O.W. and Meister, A.
J. Biol. Chem. 254, 7558-7560, 1979
12. Liu, B., and Hannun, Y.A.
J. Biol. Chem. 272, 16281-16287, 1997
13. Li, Y., Maher, P. and Schubert, D.
Neuron 19, 453-463, 1997
14. Li, Y., Maher, P. and Schubert, D.
J. Cell Biol. 139, 1317-1324, 1997
15. Choi, D.W.
J. Neurosci. 7, 369-379, 1987
16. Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S. and Snyder, S.H.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6368-6371, 1991
17. Zhang, P., Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Ceballos-Picot, I., Sinet, P.M., Nicole, A., Laurent, M. and Javoy-Agid, F.,

Neuroscience 55, 167-175, 1993

18. Sawada, H., Shimohama, S., Kawamura, T., Akaike, A., Kitamura, Y., Taniguchi, T. and Kimura, J.
J. Neurosci. Res. 46, 509-518, 1996
19. Gonzalez-Zulueta, M., Ensz, L.M., Mukhina, G., Lebovitz, R.M., Zwacka, R.M., Engelhardt, J.F., Oberley, L.W., Dawson, V.L. and Dawson, T.M.
J. Neurosci. 18, 2040-2055, 1998
20. Konorev, E.A., Tarpey, M.M., Joseph, J., Baker, J.E. and Kalyanaraman, B.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 274, 200-206, 1995
21. Rauhala, P., Lin, A.M., and Chiueh, C.C.
FASEB J. 12, 165-173, 1998
22. Nakamura, K., Wang, W. and Kang, U.J.
J. Neurochem. 69, 1850-1858, 1997
23. Drapier, J.C., Hirling, H., Wietzerbin, J., Kaldy, P. and Kuhn, L.C.
EMBO J. 12, 3643-3649, 1993
24. Klausner, R.D., Rouault, T.A. and Harford, J.B.
Cell 72, 19-28, 1998
25. Pantopoulos, K. and Hentze, M.W.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1267-1271, 1995
26. Gorski, R.A., Herlan, R.E., Jacobson, C.D., Shryne, J.E. and Southane, A.M.
J. Comp. Neurol. 193, 529-539, 1980
27. Singh, M., Meyer, E.M., Millard, W.J. and Simpkins, J.W.
Brain Res. 644, 305-312, 1994
28. Birge, S.J.
Neurology 48, S36-S41, 1997
29. Li, S.C., Schoengerg, B.S., Wang, C.C., Cheng, X.M., Rui, D.Y., Bolis, C.L. and Schoenberg, D.G.
Arch. Neurol. 42, 655-657, 1985
30. Singer, C.A., Rogers, K.L., Strickland, T.M. and Dorsa, D.M.
Neurosci. Lett. 212, 13-16, 1996
31. Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J. and Holsboer, F.
Mol. Pharmacol. 51, 535-541, 1997
32. Sawada, H., Kawamura, T., Shimohama, S., Akaike, A. and Kimura, J.
J. Neurosci. Res. 43, 503-510, 1997
33. LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C.
Chem. Res. Toxicol. 5, 227-231, 1992

34. Rao, K.M., Padmanabhan, J., Kilby, D.L., Cohen, H.J., Currie, M.S. and Weinberg, J.B.
J. Leukoc. Biol. 51, 496-500, 1992
35. Peach, K., Webb, P., Kuiper, G.C., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. and Scanlan, T.S.
Science 277, 1508-1510, 1998
36. Shughrue, P.J., Lane, M.V. and Merchenthaler, I.
J. Comp. Neurol. 388, 507-525, 1997
37. Kuiper, G.C., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A.
Endocrinology 138, 863-870, 1997
38. Kaneda, K., Kashii, S., Kurosawa, T., Kaneko, S., Akaike, A., Honda, Y., Minami, M. and Satoh, M.
Brain Res. 815, 11-20, 1999
39. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A.
J. Cell. Biol. 119, 493-501, 1992
40. Charriaut-Marlangue, C. and Ben-Ari, Y.
Neuroreport 7, 61-64
41. Saraste, A.
Herz 24, 189-195, 1999
42. Wever Jr, C.E., Park-chung, M., Gibbs, T.T. and Farb, D.H.
Brain Res. 761, 338-341, 1997
43. Mermelstein, P.G., Becker, J.B. and Surmeier D.J.
J. Neurosci. 16, 595-604, 1996
44. Horvat, A., Nikezic, G and Martinovic, J.V.
Experientia 51, 11-15, 1995
45. Paul, S.M. and Purdy, R.H.
FASEB J. 6, 2311-2322, 1992
46. Green, P.S., Gridley, K.E. and Simpkins, J.W.
Neurosci. Lett. 218, 165-168, 1996
47. Gridley, K.E., Green, P.S. and Simpkins, J.W.
Mol. Pharmacol. 54, 874-880, 1998
48. Mooradian, A.D.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 45, 509-511, 1993
49. Genc, S., Gurdol, F., Oner-lyidogan, Y. and Suzme, R.
Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 105, 253-261, 1999
50. Isikawa, Y., Yokoo, T. and Kitamura, M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 240, 496-501, 1995

51. Arnold, S.F. and Notides, A.C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7475-7479, 1995
52. Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H.,
Okuma, M. and Umehara, H.
J. Biol. Chem. 270, 27326-27331, 1995
53. Chen, H. and Tan, T.H.
Oncogene 17, 173-178, 1998.
54. Arnold, S.F. and Notides, A.C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7475-7479, 1995
55. Mellanby, E.
Lancet 1, 407-412, 1919
56. Windaus, A., Schenck, F.R. and von Werder, F.
Z. Physiol. 241, 100-103, 1936
57. Lemire, J.
The role of vitamin D in immunosuppression: lessons from autoimmunity and transplantation.
Vitamin D edited by D. Feldman, J.W. Pike and F.H. Glorieux. San Diego: Academic, 1167-
1181, 1997
58. Pols H.A., Birkenhager J.C., foenkens J.A., and van Leeuwen J.P.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 37, 873-876, 1990
59. Bower, M., Colston, K.W., Stein, R.C., Hedley, A., Gazet, J.C., Ford, H.T. and Coombes, R.C.
Lancet 337, 701-702, 1991
60. Chertow, B.S., Sivitz, W.I., Baranetsky, N.G., Clark, S.A., Waite, A. and Deluca, H.F.
Endocrinology 113, 1511-1518, 1983
61. Bouillon, R., Okamura, W. H. and Norman, A.H.
Endocr. Rev. 16, 200-257, 1995
62. Pardridge, W.M., Sakiyama, R. and Coty, W.A.
J. Neurochem. 44, 1138-1141, 1985
63. Prufer, K., Veenstra, T.D., Jirikowski, G.F. and Kumar, R.
J. Chem. Neuroanatomy 16, 135-145, 1999
64. Veenstra, T.D., Prufer, K., Koenigsberger, C., Brimijoin, S.W., Grande, J.P. and Kumar, R.
Brain Res. 804, 193-205, 1998
65. Neveu, I., Naveilhan, P., Menaa, C., Wion, D., Brachet, P. and Garabedian, M.
J. Neurosci. Res. 38, 214-220, 1994
66. Neveu, I., Naveilhan, P., Jehan, F., Baudet, C., Wion, D., DeLuca, H.F. and Metsis, M.
Mol. Brain Res. 24, 70-76, 1994

67. Neveu, I., Naveilhan, P., Baudet, C., Brachet, P. and Metsis, M.
Neuroreport 6, 124-126, 1994
68. Sutherland, M.K., Somerville, M.J., Yoong L.K.K., Bergeron, C., Haussler, M.R., Crapper, D.R. and McLachlan, C.
Mol. Brain Res. 13, 239-250, 1992
69. Sato, Y., Kikuyama, M. and Oizumi, K.
Neurology 49, 1273-1278, 1997
70. Derex, L. and Trouillas, P.
Mov. Disorder 12, 612-613, 1997
71. Folgueira, M.A., Federico, M.H., Katayama, M.L., Silva, M.R. and Brentani, M.M.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 66, 193-201, 1998
72. Bouillon, R., Okamura, W. and Norman, A.W.
Endocr. Rev. 16, 200-257, 1995
73. Nemere, I., and Campbell, K.
Steroids 65, 451-457, 2001
74. Morelli, S., Boland, A.R., and Boland, R.L.
Biochem.J. 289, 675-679, 1993
75. Song, X., Bishop, J.E., Okamura, W.H. and Norman, A.W.
Endocrinology. 139, 457-465, 1998
76. Marcinkowska, E., Wiedlocha, A. and Radzikowski, C.
Anticancer Res. 18, 3507-3514, 1998
77. Singh, M., Setalo, G, Jr., Guan, X., Warren, M. and Taran-Allerand, D.M.
J. Neurosci. 19, 1179-1188, 1999
78. Sawada, S., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Nakanishi, M., Akaike, A. and Shimohama, S.
J. Neurochem. 74, 1175-1184, 2000
79. Wang, Y., Chiang, Y.-H., Su, T.-P., Hayashi, T., Morales, M., Hoffer, B.J. and Lin, S.-Z.
Neuropharmacology 39, 873-880, 2000
80. Alexianu, M.E., Robbins, E., Carswell, S. and Appel, S.H.
J. Neurosci. Res. 51, 58-66, 1998
81. Phillips, R.G., Meier, T.J., Giuli, L.C., McLaughlin, J.R., Ho, D.Y. and Sapolsky, R.M.
J. Neurochem. 73, 1200-1205, 1999
82. Wernyj, R.P., Mattson, M.P. and Christaskos, S.
Mol. Brain Res. 64, 69-79, 1999
83. Muthane, U., Ramsay, K.A., Jing, H., Jackson-Lewis, V., Ferreira, M. and Przedborski, S.
Exp. Neurol. 126, 195-204, 1994
84. Garcion, E., Sindji, L., Leblondel, G., Brachet, P. and Darcy, F.
J. Neurochem. 73, 859-866, 2000

85. Ferret, P.J., Soum, E., Negre, O., Wollman, E.E. and Fradelizi, D.
Biochem. J. 346, 759-765, 2000
86. Takagi, Y., Mitsui, A., Nishiyama, A., Nozaki, K., Gon, Y., Hashimoto, N. and Yodoi, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4131-4136, 1999
87. Karasawa, M., Hosoi, J., Hashiba, H., Nose, K., Tohyama, C., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8810-8813, 1987
88. Montoliu, C., Monfort, P., Carrasco, J., Palacios, O., Capdevila, M., Hidalgo, J. and Felipo, V.
J. Neurochem. 75, 266-273, 2000
89. van Lookeren-Campagne, M., Thibodeux, H., van Bruggen, N., Cairns, B., Gerlai, R., Palmer, J.T., Williams, S.P. and Lowe, D.G.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 12870-12875, 1999